

富硒食品中无机硒的测定

原子荧光形态分析法编制说明

1、工作简况

1.1 任务来源

湖北省卫生计生委 2016 年 5 月下达的《食品中无机硒的测定 高效液相—原子荧光光谱法》食品安全地方标准项目 (<http://www.hbwsjs.gov.cn>)。

1.2 起草单位、起草人

本标准起草单位：恩施自治州农业科学院、国家富硒产品质量监督检验中心。

本标准起草人：陈永波、李卫东、黄光昱、胡百顺、刘淑琴、薛华、廖美林、秦邦、吴蓉、马作江、陈娥、朱发厅、熊倩、周灵、陈卉。

1.3 简要起草过程

1.3.1 确定标准的目的和意义

亚硒酸盐和硒酸盐是存在于富硒食品、保健品、硒强化剂中无机硒的主要形态：第一类是硒酸盐、亚硒酸盐，纯的亚硒酸钠总无机硒为 44.67%，硒酸钠总无机硒 41.80%，主要作为富硒食品添加剂的来源，需要进行纯度检测；第二类是富硒保健品原料，如酵母硒，麦芽硒，硒多糖、硒蛋白粉、碎米荠等，总无机硒大于 100 mg/kg；第三类是富硒药品和保健品，如硒酵母片、硒蛋白胶囊、硒蛋白片、

硒虫草、硒维康及其他硒添加剂，根据第三次世界硒都（恩施）硒产品博览交易会 2016 年参展产品权威发布的结果，总无机硒在 10-3000mg/kg 之间的产品近 100 种，有机硒的比例在 39.5%-88.5%之间，也就是说无机比例为 11.5%-60.5%，含量在 1-1800mg/kg 之间。第四类是富硒食品，如富硒茶，富硒米、富硒鸡蛋、富硒水产品、富硒肉等，按照 DBS42/002-2014 富有机硒食品无机硒要求（湖北省食品安全地方标准）规定：富有机硒食品的定义为“食品中总无机硒达到规定指标，且有机无机硒 \geq 总硒 80%的食品”，总无机硒在 0.20 mg/kg 以上。以上四类硒产品中，除硒酸盐、亚硒酸盐外，后三类均以有机硒为主，无机硒作为限量指标。

随着有机硒资源的开发利用和人们对无机硒毒性的认识，药品、保健品中有机硒的含量和无机硒的限量成为评价产品质量的重要指标，现行国家标准中仅规定总无机硒的检测方法（GB/T 5009.93-2010 食品中硒的测定），未分析硒的形态，因此不能正确评价富硒产品的补硒效果。有些地方标准中制定了有机硒的检测方法，但均采用先提取分离有机硒和无机硒，再用测总硒的方法测定无机硒，前处理方法繁杂，且分离、提取不完全会影响结果的准确性。我们在研究中发现，聚硒植物碎米荠的总无机硒高达 3000 mg/kg 以上，按 DBS42/002-2014 的方法测定无机硒高达 50%以上，而采用 HPLC-HG-AFS 法测定用环己烷萃取前、后水相中的成分，主要是硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸，在萃取前后变化不大；无机硒非常少，Se(IV)未检出，Se(VI)需要在进样 50 μ L 才能检测出来，因此 DBS42/002-2014 不适宜于碎米荠中无机硒的测定，以碎米荠为原料开发的硒蛋

白粉、硒蛋白片等也存在同样的问题，给企业带来很大的困惑。硒的形态分析方法是近年来发展的方向，能够有效分离有机硒和无机硒，但由于有机硒形态复杂，很多成分还没有标准物质，无法完全分离和定性定量，直接测定有机硒的形态方法还不成熟，而随着 HPLC-ICP-MS 及 HPLC-HG-AFS 联用技术的发展，无机硒中 Se(IV) 和 Se(VI) 测定的仪器方法灵敏度高，适用性强，能克服采用总硒测定无机硒方法的不足。

食品中的无机硒提取方法研究报道较多，如：直接用水提取食盐中的无机硒；用水提取、环己烷萃取螺旋藻中无机硒；用 50% 的盐酸提取鲈鱼、对虾、梭子蟹等水产品中的无机硒；用 Tris-HCl 溶液提取蒜薹、鸭蛋、富硒酵母中的无机硒；用无水乙醇提取玉米、大豆、花生等杂粮中的无机硒；用甲苯提取蕲艾中的无机硒等，但没有系统研究无机硒提取方法的报道。

本标准旨在确定各类硒产品（包括硒添加剂和富硒食品）中无机硒提取的最佳方法和仪器分析的最佳条件，确保方法的精密度、准确性达到分析要求，同时兼顾方法的便捷性、经济性和时效性，并通过有资质的实验室验证，使之成为适合不同类型硒产品中无机硒分析的标准方法。研究结果对于提高硒产品质量安全监管，完善地方标准，便于质量管理和检验部门对产品的检验具有重要意义。

1.3.2 标准的立项

项目承担单位恩施自治州农业科学院从事硒的分析测试和形态分析方法研究工作已有 20 多年，曾采用紫外-可见分光光度法、原子吸收光谱法、氢化物原子吸收光谱法进行总无机硒的测定。

2008 年：开始采用 HPLC 测定氨基酸的方法进行硒的形态分析研究工作，建立了硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸的仪器分析方法，但在实际样品分析中，水解氨基酸中大量的其它氨基酸导致微量的硒代氨基酸不能定性定量分析，而且无机硒在 C₁₈ 柱上没有保留，研究工作一度陷入困境。

2012 年：开始采用原子荧光形态分析仪进行硒的形态分析方法研究，该设备结合了 HPLC 的高效分离与 AFS 对硒高灵敏度、硒空芯阴极灯高专一性检测的优点，解决了其它非含硒成分干扰的问题，适宜样品中含硒小分子物质和无机硒的测定，于是于 2013 年申请单位购买了原子荧光形态分析仪，并与原有的 HPLC 联用，形成了 HPLC-AFS 联用仪，开始了该标准的基础研究，采用阴离子交换柱、C₁₈ 色谱柱对不同手型的硒代氨基酸、二甲基硒、二甲基二硒醚、硒酸盐、亚硒酸盐等多种硒形态的色谱分析条件进行研究，建立了硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸、L-硒甲基硒代半胱氨酸、Se(IV) 和 Se(VI) 的仪器分析方法，取得了实质性进展。

2015 年：为了修订和完善 DBS42/002-2014 中无机硒的测定方法，恩施州硒研究院与国家富硒产品质量监督检验中心共同申报了地方标准《富硒食品中无机硒的测定 高效液相色谱-原子荧光光谱法》制定项目，9 月 22 日，省标委会秘书处组织食品安全、食品检验等部分专家赴恩施开展该项目的立项调研，经与会专家充分讨论，建议批准立项。

2016 年 4 月 29 日，省卫计委召开了湖北省食品安全标准评审委员会第十一次全体会议，与会专家一致同意立项。同年 5 月 10 日，

湖北省卫生计生委下达了“关于批准《恩施腊肉生产技术规范》等3项食品安全地方标准立项的公告”：根据《湖北省食品安全地方标准管理办法》的规定，经湖北省食品安全标准审评委员会审查，批准该标准立项。

1.3.3 收集典型样品

为确保标准的广泛适用性，收集了具有代表性的含无机硒的制品：硒酸钠、亚硒酸钠、硒蛋白粉、硒蛋白片、碎米荠干粉、硒蛹虫草压片系列（番茄蒜素片、大豆提取物片、肉桂桑黄片、人参玛咖片、食用菌粉片）、硒矿泉水、富硒植物油等，经测定，总无机硒硒酸钠、亚硒酸钠 $\geq 40\%$ ，硒蛋白粉 $\geq 1000\text{mg/kg}$ ，硒蛋白片 $\geq 100\text{mg/kg}$ ，碎米荠干粉 $\geq 2000\text{mg/kg}$ ，硒蛹虫草系列产品 $\geq 60\text{mg/kg}$ ，其它样品能检出总硒。

碎米荠，又叫野油菜，十字花科，是迄今为止发现的世界第三大聚硒植物，也是富硒地带的指示作物，人工培植含硒量可达 3000mg/kg 以上，当地人有当作野菜食用的习惯，现作为提取硒蛋白粉的原料，提取物也可作为硒强化剂。现恩施州硒研究院、国家富硒产品质量监督检验中心、恩施德源健康科技发展有限公司等单位和企业正在开展食用历史考证，申请地理标志产品，申报新资源食品，因此列入该标准的检测范围内。

1.3.4 试验验证

在查阅了大量国内外相关文献资料和综合调研结果的基础上，拟定了“富硒食品中无机硒的测定 高效液相色谱-原子荧光光谱法”试验方案，包括提取方法选择、色谱条件的优化、前处理条件的优

化等条件试验，并对方法的线性范围、最低检出线、精密度、重复性、回收率以及方法的适用性等进行了研究。在方法的精密度和重现性验证中，样品中必需能检测出无机硒，因此我们选择了硒酸钠、亚硒酸钠、硒蛋白粉、硒蛹虫草压片、矿泉水、植物油等样品进行实验室之间的比对试验。

1.3.5 形成征求意见稿

恩施自治州农业科学院在完成相关技术研究的基础上，由国家硒监督检验中心协作实验室对方法的技术参数进行了相关试验、验证和评价，根据《湖北省食品安全地方标准文本编写细则》等的规定，制定了本标准的征求意见稿。

1.3.6 征求专家意见

征求意见稿形成后，发到湖北省大专院校、科研院所和企业等10家单位相关专家征求意见，同时了解单位设备配置情况。将专家意见收集后，形成专家意见汇总表，对采纳与不采纳的意见均说明原因，同时根据专家的意见完善标准的相关内容。

1.3.7 形成标准送审报告

将标准送审稿、编写说明、立项建议书、立项公告、会议纪要、专家意见、验证报告等资料收集齐备后，按照湖北省食品安全地方标准送审报告的要求，形成标准送审稿，报送省卫计委综合监督局食品安全标准管理处。

根据在标准编制过程中的第三次会议纪要，本次送审稿只报送《富硒食品中无机硒的测定 原子荧光光谱法》1项标准，但为了保持方法的完整性，编制说明中方法研究部分及验证报告中硒酸盐、

亚硒酸盐中无机硒测定的相关内容仍然保留。

2、与我国有关法律法规和其他标准的关系

在标准研制过程中，我们查阅了国内外有关无机硒测定的有关标准、分析方法、论文等资料文献，查询了联合国粮农组织 (FAO)、国际卫生组织 (WHO)、食品法典委员会 (CAC) 等网站及 ISO、农业标准、国家标准等资料，国内硒相关的标准如下：

2.1 现行有效国家标准（硒）

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|--------------------|---|------------|-----------|-----------|
| 1 | GB 26418-2010 | 饲料中硒的允许量 | 2011-1-14 | 2011-7-1 | 2017-3-23 |
| 2 | GB/T 11067.3-200.. | 银化学分析方法 硒和碲量的测定 电感耦合等离子体原子发射光谱法 | 2006-9-26 | 2007-2-1 | |
| 3 | GB/T 11902-1989 | 水质 硒的测定 2,3-二氨基萘荧光法 | 1989-11-3 | 1990-7-1 | |
| 4 | GB/T 13883-2008 | 饲料中硒的测定 | 2008-8-1 | 2008-11-1 | |
| 5 | GB/T 14352.16-20.. | 钨矿石、钼矿石化学分析方法 第 16 部分：硒量测定 | 2010-11-10 | 2011-2-1 | |
| 6 | GB/T 14353.15-20.. | 铜矿石、铅矿石和锌矿石化学分析方法 第 15 部分：硒量测定 | 2014-12-4 | 2015-4-1 | |
| 7 | GB/T 15505-1995 | 水质 硒的测定 石墨炉原子吸收分光光度法 | 1995-3-15 | 1995-8-1 | |
| 8 | GB/T 16415-2008 | 煤中硒的测定方法. 氢化物发生原子吸收法 | 2008-7-29 | 2009-5-1 | |
| 9 | GB/T 20127.10-20.. | 钢铁及合金. 痕量元素的测定. 第 10 部分; 氢化物发生-原子荧光光谱法测定硒含量 | 2006-3-2 | 2006-9-1 | |
| 10 | GB/T 21729-2008 | 茶叶中硒含量的检测方法 | 2008-5-4 | 2008-10-1 | 2017-10-6 |
| 11 | GB/T 223.52-1987 | 钢铁及合金化学分析方法 盐酸羟胺-碘量法测定硒量 | 1987-5-12 | 1988-3-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|--------------------|--|------------|-----------|------|
| 12 | GB/T 23607-2009 | 铜阳极泥化学分析方法. 砷、铋、铁、镍、铅、锑、硒、碲量的测定. 电感耦合等离子体原子发射光谱法 | 2009-4-15 | 2010-2-1 | |
| 13 | GB/T 26193-2010 | 玩具材料中可迁移元素锑、砷、钡、镉、铬、铅、汞、硒的测定 电感耦合等离子体质谱法 | 2011-1-14 | 2011-6-1 | |
| 14 | GB/T 26249-2010 | 电子工业用气体 硒化氢 | 2011-1-14 | 2011-5-1 | |
| 15 | GB/T 26289-2010 | 高纯硒化学分析方法 硼、铝、铁、锌、砷、银、锡、锑、碲、汞、镁、钛、镍、铜、镓、镉、铟、铅、铋量的测定 电感耦合等离子体质谱法 | 2011-1-14 | 2011-11-1 | |
| 16 | GB/T 30419-2013 | 玩具材料中可迁移元素锑、砷、钡、镉、铬、铅、汞、硒的测定 电感耦合等离子体原子发射光谱法 | 2013-12-31 | 2014-12-1 | |
| 17 | GB/T 32448-2015 | 胶粘剂中可溶性重金属铅、铬、镉、钡、汞、砷、硒、锑的测定 | 2015-12-31 | 2016-7-1 | |
| 18 | GB/T 3253.6-2008 | 锑及三氧化二锑化学分析方法. 硒量的测定. 原子荧光光谱法 | 2008-3-31 | 2008-9-1 | |
| 19 | GB/T 4103.7-2012 | 铅及铅合金化学分析方法 第7部分: 硒量的测定 | | 2013-10-1 | |
| 20 | GB/T 5121.24-200.. | 铜及铜合金化学分析方法. 第24部分: 硒、碲含量的测定 | 2008-6-17 | 2008-12-1 | |
| 21 | GB/T 5121.28-201.. | 铜及铜合金化学分析方法 第28部分: 铬、铁、锰、钴、镍、锌、砷、硒、银、镉、锡、锑、碲、铅、铋量的测定 电感耦合等离子体质谱法 | 2011-1-10 | 2011-10-1 | |
| 22 | GB/T 8654.6-1988 | 金属锰化学分析方法 盐酸联氨-碘量法测定硒量 | 1988-2-5 | 1989-2-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|-------------------|-------------------------------|------------|-----------|-----------|
| 23 | GB 1903.12-2015 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 L-硒-甲基硒代半胱氨酸 | | 2016-5-13 | |
| 24 | GB 1903.12-2015 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 L-硒-甲基硒代半胱氨酸 | 2015-11-13 | 2016-5-13 | |
| 25 | GB 1903.21-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒酵母 | | 2017-6-23 | |
| 26 | GB 1903.21-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒酵母 | 2016-12-23 | 2017-6-23 | |
| 27 | GB 1903.22-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉 | | 2017-6-23 | |
| 28 | GB 1903.22-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉 | 2016-12-23 | 2017-6-23 | |
| 29 | GB 1903.23-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒化卡拉胶 | | 2017-6-23 | |
| 30 | GB 1903.23-2016 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒化卡拉胶 | 2016-12-23 | 2017-6-23 | |
| 31 | GB 1903.9-2015 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 亚硒酸钠 | | 2016-5-13 | |
| 32 | GB 1903.9-2015 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 亚硒酸钠 | 2015-11-13 | 2016-5-13 | |
| 33 | GB 5009.93-2010 | 食品安全国家标准 食品中硒的测定 | 2010-3-26 | 2010-6-1 | 2017-10-6 |
| 34 | GB 5009.93-2017 | 食品安全国家标准 食品中硒的测定 | 2017-4-6 | 2017-10-6 | |
| 35 | GB/T 22499-2008 | 富硒稻谷 | 2008-11-4 | 2009-1-20 | |
| 36 | GB/T 24370-2009 | 硒化镉量子点纳米晶体表征. 紫外-可见吸收光谱方法 | 2009-9-30 | 2009-12-1 | |
| 37 | GBZ/T 160.34-2004 | 工作场所空气有毒物质测定 硒及其化合物. | 2004-5-21 | 2004-12-1 | |

2.2 现行有效国家标准（硒）

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|------------------|-------------------------------|------------|------------|-----------|
| 1 | EJ/T 20052-2014 | 铯-139、镱-169 和硒-75 放射性标准溶液规范 | 2014-11-17 | 2015-2-1 | |
| 2 | GH/T 1090-2014 | 富硒茶 | 2014-6-23 | 2014-10-1 | |
| 3 | GH/T 1135-2017 | 富硒农产品 | 2017-4-25 | 2017-9-1 | |
| 4 | HG/T 4517-2013 | 工业亚硒酸钠 | 2013-10-17 | 2014-3-1 | |
| 5 | HG/T 4697-2014 | 工业硒酸钠 | 2014-12-24 | 2015-6-1 | |
| 6 | HG/T 4698-2014 | 工业亚硒酸锌 | 2014-12-24 | 2015-6-1 | |
| 7 | MT/T 1028-2006 | 煤中硒含量分级 | 2006-11-2 | 2006-12-1 | |
| 8 | MT/T 1045-2007 | 煤矿水中硒的测定 | 2007-10-22 | 2008-1-1 | |
| 9 | NY 47-1987 | 饲料级亚硒酸钠 | | | |
| 10 | NY/T 1104-2006 | 土壤中全硒的测定 | 38908 | 2006-10-1 | |
| 11 | NY/T 1945-2010 | 饲料中硒的测定 微波消解-原子荧光光谱法 | 2010-9-21 | 2010-12-1 | |
| 12 | NY/T 1972-2010 | 水溶肥料钠、硒、硅含量的测定 | 2010-12-23 | 2011-2-1 | |
| 13 | NY/T 600-2002 | 富硒茶 | 2002-11-5 | 2002-12-20 | |
| 14 | SL 327.3-2005 | 水质. 硒的测定. 原子荧光光度法 | 2005-10-21 | 2006-1-1 | |
| 15 | SN/T 0515-1995 | 出口硫磺中硒的测定. 荧光法 | 1995-12-15 | 1996-5-1 | |
| 16 | SN/T 0926-2000 | 进出口茶叶中硒的检验方法荧光光度法 | 2000-6-22 | 2000-11-1 | 2017-10-6 |
| 17 | SN/T 1031.5-2001 | 出口粗氧化锑化学分析方法. 硒含量的测定 | 2001-12-30 | 2002-6-1 | |
| 18 | SN/T 4060-2014 | 出口保健品中硒酸和亚硒酸含量的测定 | | 2015-5-1 | |
| 19 | SN/T 4526-2016 | 出口水产品中有机硒和无机硒的测定 氢化物发生原子荧光光谱法 | 2016-6-28 | 2017-2-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|-------------------|------------------------------------|------------|-----------|------|
| 20 | WJ 2422-1997 | 铜碲硒铁合金材料中碲的测定方法 | 1905-6-19 | | |
| 21 | WJ 2423-1997 | 铜碲硒铁合金材料中硒的测定方法 | 1905-6-19 | | |
| 22 | WS/T 109-1999 | 血清中硒的氢化物发生-原子吸收光谱测定方法 | 1999-1-21 | 1999-7-1 | |
| 23 | WS/T 47-1996 | 尿中硒的氢化物发生-原子吸收光谱测定方法 | 1996-10-14 | 1997-5-1 | |
| 24 | YC/T 380-2010 | 烟草及烟草制品 铬、镍、砷、硒、镉、铅的测定 电感耦合等离子体质谱法 | | 2011-1-15 | |
| 25 | YS/T 1055-2015 | 硒化锌 | 2015-4-30 | 2015-10-1 | |
| 26 | YS/T 223-2007 | 硒 | 2007-11-14 | 2008-5-1 | |
| 27 | YS/T 226.12-2009 | 硒化学分析方法. 第12部分: 硒量的测定. 硫代硫酸钠容量法 | 2009-12-4 | 2010-6-1 | |
| 28 | YS/T 226.14-1994 | 硒中碳量的测定(燃烧电导法) | | | |
| 29 | YS/T 34.2-2011 | 高纯砷化学分析方法. 极谱法测定硒量 | 2011-12-20 | 2012-7-1 | |
| 30 | YS/T 651-2007 | 二氧化硒 | 2007-11-14 | 2008-5-1 | |
| 31 | YS/T 816-2012 | 高纯硒 | | 2013-3-1 | |
| 32 | DZ/T 0064.37-1993 | 地下水水质检验方法. 催化极谱法测定硒 | 1993-2-27 | 1993-10-1 | |
| 33 | DZ/T 0064.38-1993 | 地下水水质检验方法. 原子荧光法微量硒 | 1993-2-27 | 1993-10-1 | |
| 34 | EJ/T 754-1993 | 原子荧光光谱法测定含铀岩石中的微量硒 | 1993-4-14 | 1993-10-1 | |
| 35 | GH/T 1090-2014 | 富硒茶 | | 2014-10-1 | |
| 36 | HJ 680-2013 | 土壤和沉积物 汞、砷、硒、铋、锑的测定 微波消解原子荧光法 | 2013-11-21 | 2014-2-1 | |
| 37 | HJ 694-2014 | 水质 汞、砷、硒、铋和锑的测定 原子荧光法 | 2014-3-13 | 2014-7-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|-------------------|--|-----------|-----------|-----------|
| 38 | HJ 702-2014 | 固体废物 汞、砷、硒、铋、锑的测定 微波消解/原子荧光法 | 2014-9-2 | 2014-11-1 | |
| 39 | HJ 811-2016 | 水质 总硒的测定 3,3'-二氨基联苯胺分光光度法 | | 2016-10-1 | |
| 40 | NY 861-2004 | 粮食(含谷物、豆类、薯类)及制品中铅、镉、铬、汞、硒、砷、铜、锌等八种元素限量 | 2005-1-4 | 2005-2-1 | |
| 41 | NY 861-2004 | 粮食(含谷物、豆类、薯类)及制品中铅、镉、铬、汞、硒、砷、铜、锌等八种元素限量 | 2005-1-4 | 2005-2-1 | |
| 42 | SL/T 272-2001 | 水质 总硒的测定铁(Ⅱ)-邻菲罗啉间接分光光度法 | 2005-10-2 | 2006-01-0 | |
| 43 | SL/T 272-2001 | 水质.总硒的测定.铁(Ⅱ).邻菲罗啉间接分光光度法 | 2001-9-11 | 2001-12-1 | |
| 44 | SN/T 0860-2000 | 出口蘑菇罐头中硒的测定方法.荧光分光光度法 | 2000-6-22 | 2000-11-1 | 2017-7-1 |
| 45 | SN/T 0860-2016 | 出口食品中硒的测定方法 | | 2017-7-1 | |
| 46 | SN/T 0926-2000 | 进出口茶叶中硒的检验方法 荧光光度法 | | | 2017-10-6 |
| 47 | SN/T 2092-2008 | 进出口锑锭中硒含量的测定.原子荧光光谱法 | 2008-4-29 | 2008-11-1 | |
| 48 | SN/T 2208-2008 | 水产品中钠、镁、铝、钙、铬、铁、镍、铜、锌、砷、锶、钼、镉、铅、汞、硒的测定 微波消解-电感耦合等离子体-质谱法 | | | 2017-10-6 |
| 49 | SN/T 4526-2016 | 出口水产品中有机硒和无机硒的测定 氢化物发生原子荧光光谱法 | | 2017-2-1 | |
| 50 | SN/T 4675.19-2016 | 出口葡萄酒中钠、镁、钾、钙、铬、锰、铁、铜、锌、砷、硒、银、镉、铅的测定 | | 2017-7-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 作废日期 |
|----|-----------------|--|-----------|-----------|------|
| 51 | SN/T 4759-2017 | 进口食品级润滑油(脂)中锑、砷、镉、铅、汞、硒元素的测定方法 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法 | | 2017-12-1 | |
| 52 | WS/T 130-1999 | 作业场所空气中硒的氢化物发生-原子吸收光谱测定 | | 2000-5-1 | |
| 53 | YC/T 221-2007 | 烟草及烟草制品 硒的测定 原子荧光法 | 2007-7-5 | 2007-9-1 | |
| 54 | YC/T 379-2010 | 卷烟 主流烟气中铬、镍、砷、硒、镉、铅的测定 电感耦合等离子体质谱法 | | 2011-1-15 | |
| 55 | YS/T 715.1-2009 | 二氧化硒化学分析方法.第1部分二氧化硒量的测定.硫代硫酸钠滴定法 | 2009-12-4 | 2010-6-1 | |

2.3 现行有效地方标准(硒)

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 省份 |
|----|-------------------|-------------------------|------------|------------|-----|
| 1 | DB22/T 1970-2013 | 水产品中硒的测定 石墨炉原子吸收光谱法 | | | |
| 2 | DB22/T 1981-2013 | 保健食品中硒的测定 原子荧光光谱法 | | | |
| 3 | DB3201/T 018-2003 | 无公害富硒水稻生产技术规程 | | | |
| 4 | DB3301/T 117-2007 | 稻米中有机硒和无机硒含量的测定 原子荧光光谱法 | 2007-12-21 | 2007-12-28 | 杭州 |
| 5 | DB34/T 1752-2012 | 地理标志产品 石台富硒茶 | 2012-12-24 | 2013-1-24 | 安徽省 |
| 6 | DB34/T 814-2008 | 饲料中硒的测定 原子荧光法 | 2008-8-1 | 2008-8-1 | 安徽省 |
| 7 | DB34/T 846-2008 | 富硒稻种植技术规范 | 2008-8-13 | 2008-8-13 | 安徽省 |
| 8 | DB34/T 847-2008 | 富硒大米 | 2008-8-13 | 2008-8-13 | 安徽省 |
| 9 | DB36/T 566-2009 | 富硒食品硒含量分类标准 | | | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 | 省份 |
|----|--------------------|-------------------------|------------|------------|-----|
| 10 | DB41/T 271-2001 | 硒盐 | | | |
| 11 | DB42/T 143-2002 | 富硒茶 | | | |
| 12 | DB42/T 438-2007 | 硒虫草子实体 | | | |
| 13 | DB46/T 239-2013 | 地理标志产品 定安富硒大米 | | | |
| 14 | DB46/T 240-2013 | 定安富硒稻种植技术规范 | 2013-2-4 | 2013-3-1 | 海南 |
| 15 | DB50/T 705-2016 | 富硒农产品 | 2016-11-01 | 2017-01-01 | 重庆 |
| 16 | DB52/T 1003-2015 | 凤冈锌硒茶加工技术规程 | | 2015-3-15 | 贵州省 |
| 17 | DB52/T 489-2015 | 凤冈锌硒茶 | | 2015-3-15 | 贵州省 |
| 18 | DB52/T 553-2014 | 地理标志产品 丹寨硒锌米 | 2014-7-24 | 2014-8-24 | 贵州省 |
| 20 | DB61/T 307.1-2003 | 天然富硒茶标准 | | | |
| 21 | DB61/T 307.2-2013 | 紫阳富硒茶 产地环境条件 | | | |
| 22 | DB61/T 508.6-2011 | 富硒双低菜籽油 | | | |
| 23 | DB61/T 557.10-2012 | 富硒畜禽配合饲料 | | | |
| 19 | DB6124.01-2010 | 富硒食品硒含量分类标准 | 2010-11-8 | 2010-11-8 | 安康市 |
| 24 | DB6124.01-2010 | 富硒食品硒含量分类标准 | 2010-11-8 | 2010-11-8 | 安康市 |
| 25 | DB63/T 1049-2011 | 无公害农产品 富硒马铃薯 | | | |
| 26 | DB63/T 1130-2012 | 富硒娃娃菜 | | | |
| 27 | DB63/T 1155-2012 | 无公害农产品 富硒乐都紫皮大蒜 | | | |
| 28 | DBS42/ 002-2014 | 湖北省食品安全地方标准 富有机硒食品硒含量要求 | 2014-05-09 | 2014-11-01 | |

以上标准中关于食品中硒的检测技术有氢化物原子荧光法、荧

光法和原子吸收光谱法，均用于总硒的测定。与现行食品安全标准中硒的检测方法相关的有 6 个：

(1) GB/T 5009.93-2010 食品中硒的测定：该标准规定了氢化物原子荧光法和荧光法测定食品中总硒的方法。

(2) GB 1903.21-2016 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒酵母：总硒 $1000\sim 2500$ mg/kg，有机硒 $\geq 98\%$ ，用水提取富硒酵母中的无机硒后按GB/T 5009.93的方法测定水溶液中的总硒。

(3) GB 1903.22-2016 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉：总硒 $180\sim 400$ mg/kg，有机硒 $\geq 98\%$ ，用水浸提后测定水溶液中的总硒。

(4) GB 1903.23-2016 食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒化卡拉胶：总硒 $\geq 2\%$ ，有机硒 $\geq 90\%$ ，用无水乙醇提取后按GB/T 5009.93的方法测定总硒。

(5) DBS42/002-2014湖北省食品安全地方标准 富有机硒食品无机硒要求：该标准仅规定了食品中总硒、有机硒的含量要求，食品中总硒的测定方法按GB 5009.93 的规定执行，有机无机硒采用差减法，即总无机硒减去无机无机硒等于有机无机硒。无机硒的测定方法采用水浸提后用环己烷萃取，再用总硒测定方法检测。

(6) DB3301/T 117-2007 杭州市农业标准规范 稻米中有机硒和无机硒的测定—原子荧光光谱法（）：该标准采用6N 盐酸浸提无机硒，脱脂棉过滤后采用测总硒的方法测定无机硒，用差减法得到有机硒的含量。

以上测定无机硒的方法中，硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸等有机硒

小分子溶解于水，难以被甲醇、环己烷完全萃取或被脱脂棉完全吸附，造成无机硒结果结果的偏差，已不能适应于无机硒的测定。

3、国外有关法律、法规和标准情况的说明

与硒现行有效国际国外标准如下：

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 |
|----|---------------------|--|------------|------------|
| 1 | JIS K8598-1994 | 硒 | 1994-1-1 | |
| 2 | JIS K8598 AMD 1-.. | 硒(修改件 1) | 2013-3-21 | |
| 3 | JIS G1233-1994 | 钢. 硒含量的测定方法 | 1994-9-1 | |
| 4 | ASTM D3859-2015 | 水中硒含量的测试方法 | | |
| 5 | JIS H1065-2006 | 铜和铜合金中硒的测定方法 | 2006-9-20 | |
| 6 | NF T90-110-1994 | 水质--氮的基耶达(Kjeldahl)测定--矿化作用后的加硒法 | | |
| 7 | ISO 17211-2015 | 固定源排放 烟气中硒化合物的取样和测定 | | 2015-8-15 |
| 8 | BS ISO 11723-200.. | 固体矿物燃料. 砷和硒的测定. 艾氏卡混合和氢化法 | 2004-12-1 | 2004-12-1 |
| 9 | JIS G1257-20-201.. | 钢铁 - 原子吸收光谱法 - 第 20 部分: 硒的测定 - 电热原子化 | | 2013-11-20 |
| 10 | JIS K0400-67-20-.. | 水质. 硒的测定. 原子吸收分光光度计方法(氢化物技术) | 1998-3-20 | |
| 11 | ISO 11723-2004 | 固体矿物燃料. 砷和硒的测定. 艾氏卡混合物和氢化法 | 2004-11-1 | |
| 12 | ASTM D 4606-2003 | 用氢化发生法/原子吸收法测定煤中砷和硒含量的标准试验方法 | 1905-6-25 | |
| 13 | ASTM D4606-2015 | 用氢化物发生/原子吸收法测定煤中砷和硒含量的试验方法 | | |
| 14 | DIN 53770-14-200.. | 颜料和稀释剂. 溶于盐酸物质的测定. 第 14 部分: 硒含量 | 2007-9-1 | |
| 15 | BS 6068-2. 45-199.. | 水质. 第 2 部分: 物理、化学和生物化学方法. 第 45 节: 硒含量原子吸收光谱法测定 | 1993-11-15 | 1993-11-15 |
| 16 | DIN EN 14627-200.. | 食品. 痕量元素测定. 压力溶解后用氢化原子吸收光谱测定法(HGAAS)测定砷和硒的总量 | 2005-7-1 | |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 |
|----|--------------------|--|------------|------------|
| 17 | BS EN 14627-2005 | 食品.痕量元素的测定.压力分解后用氢化法原子吸收光谱测定法测定硒和砷的总含量 | 2005-5-13 | 2005-5-13 |
| 18 | DIN ISO 20280-20.. | 土壤.用电热或氢化法原子吸收光谱法测定王水土壤萃取物中的砷、锑和硒(ISO 20280-2007) | 2010-5-1 | |
| 19 | EN 14627-2005 | 食品.痕量元素测定.压力溶解后用氢化原子吸收光谱测定法(HGAAS)测定砷和硒的总量 | 2005-7-1 | |
| 20 | ISO 7523-1985 | 镍、银、砷、铋、镉、铅、锑、硒、锡和铊含量的测定 电热原子吸收光谱测定法 | 1985-12-1 | |
| 21 | ISO 20649-2015 | 婴幼儿配方奶粉和成人营养品 铬、硒、钼的测定 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS) | | 2015-11-1 |
| 22 | BS ISO 20280-200.. | 土质.使用电热或氢化法原子吸收光谱法测定王水萃取物中的砷、锑和硒 | 2008-5-30 | 2008-5-30 |
| 23 | ISO 20280-2007 | 土壤.用电热或氢化法原子吸收光谱法测定王水土壤萃取物中的砷、锑和硒 | 2007-8-1 | |
| 24 | NF X31-437-2007 | 土壤.用电热或氢化物发生原子吸收光谱法测定王水土壤萃取物中砷、锑和硒 | 2007-11-1 | 2007-11-3 |
| 25 | NF V03-095-2005 | 食品.痕量元素的测定.压力分解后用氢化法原子吸收光谱测定法测定硒和砷的总含量 | 2005-8-1 | 2005-8-5 |
| 26 | NF EN 14935-2007 | 铜的化学分析. 测定银, 砷, 铋, 镉, 钴, 铬, 铁, 锰, 镍, 铅, 锑, 硒, 硅, 碲和锌含量. 采用电热喷射的原子吸收光谱法 | | |
| 27 | DIN 38405-23-199.. | 德国检验水、废水和污泥的标准方法. 阴离子(D组). 第23部分: 用原子吸收光谱法测定硒含量(D23) | 1994-10-1 | |
| 28 | BS 6783-4-1986 | 镍、镍铁和镍合金的取样与分析. 第4部分: 用电热原子吸收光谱测定法测定银、砷、铋、镉、铅、锑、硒、锡、碲和铊的方法 | 1986-12-31 | 1986-12-31 |
| 29 | NF A08-760-2007 | 铜的化学分析. 测定银, 砷, 铋, 镉, 钴, 铬, 铁, 锰, 镍, 铅, 锑, 硒, 硅, 碲和锌含量. 采用电热喷射的原子吸收光谱法 | 2007-1-1 | 2007-1-20 |

| 序号 | 标准号 | 标准名称 | 现行发布日期 | 实施日期 |
|----|--------------------|---|-----------|-----------|
| 30 | NF V18-242-2012 | 动物饲料.微波消解(用 65%硝酸和 30%过氧化氢萃取)后用氢化物原子吸收光谱法(HGAAS)测定硒 | 2012-4-1 | 2012-4-7 |
| 31 | BS 7317-3-1990 | 高纯度铜阴极 Cu-CATH-1 分析方法.第 3 部分:采用氢化物生成和原子吸收分光光度法对锑、砷、铋、硒、碲和锡的测定方法 | 1990-7-31 | 1990-7-31 |
| 32 | BS 7317-4-1990 | 高纯度铜阴极 Cu-CATH-1 分析方法.第 4 部分:采用电热喷雾原子吸收分光光度法对锑、砷、铋、铅、硒、碲和锡的测定方法 | 1990-7-31 | 1990-7-31 |
| 33 | DIN EN 16159-201.. | 动物饲料.微波溶解后通过氯化物发生原子吸收光谱法(HGAAS)测定硒的含量(使用 65%的硝酸和 30%的过氧化氢消化).德文版本 EN 16159-2012 | 2012-4-1 | |
| 34 | EN 16159-2012 | 动物饲料.微波溶解后通过氯化物发生原子吸收光谱法(HGAAS)测定硒的含量(使用 65%的硝酸和 30%的过氧化氢消化).德文版本 EN 16159-2012 | 2012-4-1 | |
| 35 | | 9月26日,日本厚生劳动生发表告示(生食发 0926 第3号)制定了食品添加剂亚硒酸钠和天门冬酰胺酶的使用限量。 | | |

以上标准中,没有原子荧光形态分析仪测定食品中无机硒的方法。

4、标准的制(修)订原则

本标准按照《湖北省食品安全地方标准文本编写细则》的规定编写。通过查阅文献、组织专家论证、拟定试验方案、方法实验研究、实验室间验证、征求专家意见后形成标准文本。

(1) 本标准研制过程中规避了 DBS42/002-2014、DB3301/T 117-2007 等相关地方标准中先浸提、萃取无机硒,然后用测总硒的方法测定无机硒偏差大、样品范围拓展性差的问题,能满足各类样品中 Se(IV)和 Se(VI)的测定。因无机硒原料和富硒食品中无机硒的测定

在前处理方法和计算公式上差异较大，故分成《食品中无机硒的测定》、《硒酸盐、亚硒酸盐中含硒量的测定》两个标准编写。

(2) 本标准采用了具有自主知识产权的专利技术：“一种提高无机硒形态分析回收率的方法”（申请号：201710121961.1）。

(3) 本标准编写遵循先进性、经济性和普遍适用性的原则，便于推广应用。

5、确定各项技术内容的依据

5.1 HPLC-AFS 的工作原理

该设备由高效液相色谱仪、形态分析预处理装置和原子荧光光谱仪（带硒空芯阴极灯）三部分组合成联用仪。试样中的无机硒经提取或稀释、过滤后直接进样，用高效液相色谱仪分离，经形态分析预处理装置在酸性环境、氧化剂（1%碘化钾-0.5%氢氧化钾溶液）、还原剂（2%硼氢化钾-0.5%氢氧化钾溶液）作用下（Se（VI）需在紫外灯照射下）转化成硒化氢（ H_2Se ），由氩气带入原子荧光光谱仪检测，与标准样品比较，以保留时间定性，外标法定量。

5.2 仪器条件和分离度

在该分析方法中，多种形态的硒均能被检测，因此，被检测的无机硒需要与其它有机硒的形态有效分离。在方法开发中，经过反复多次试验优化，确定了如下仪器参考条件：

（1）液相色谱参考条件

色谱柱： C_{18} 色谱柱或相当者。

流动相：2%甲醇-25 $mmol \cdot L^{-1}$ -磷酸氢二铵-0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ -四丁基溴化铵溶液， $pH=6.0(4.3)$ 。

柱温：30℃。

流速：0.8 mL/min⁻1.0 mL/min。

进样量：10-100 μL。

(2) 氢化物发生条件

氧化剂：0.5% KOH +1.0% KI溶液。

还原剂：0.5% KOH +2% KBH₄溶液。

载流：7% HCl溶液。

紫外灯开/关：开。

(3) 原子荧光光谱仪条件

元素灯：硒空芯阴极灯。

负高压：300 V。

灯电流（总电流/辅电流）：80/30 mA。

载气：400mL/min。

屏蔽气：600 mL/min。

采用以上条件，对硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸、L-硒甲基半胱氨酸、Se（IV）和 Se（VI）的分离效果如下：

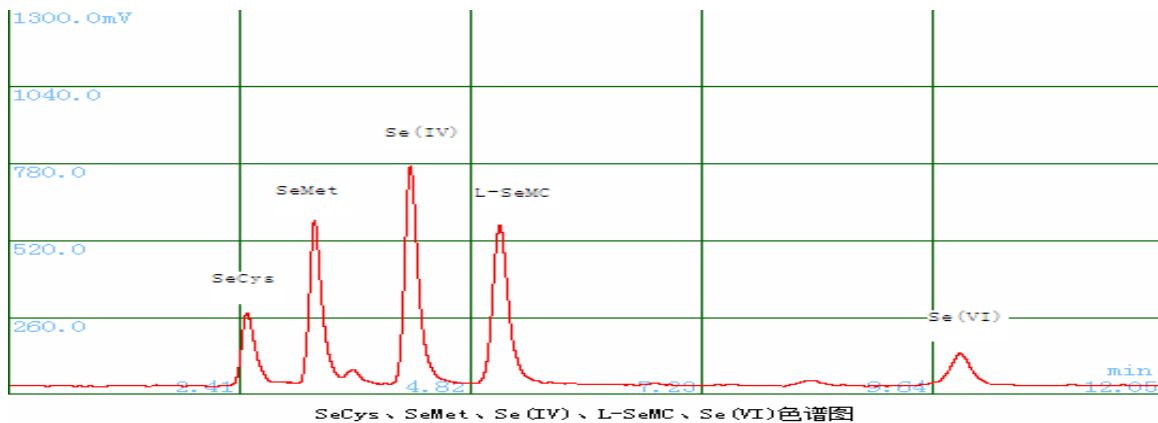


图1 硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸、L-硒甲基半胱氨酸、Se（IV）和 Se（VI）分离效果图

5.3 线性范围

5.3.1 用同一浓度标准溶液，进不同体积制作标准曲线（适合于自动进样器）

将 Se (IV)、Se (VI) 标准溶液配制成 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准混合液，分别进样 0、5、10、20、30、40、50 μL ，含硒量分别为 0、5、10、20、30、40、50 ng，以含硒量与峰面积制作标准曲线。

5.3.2 用系列不同浓度标准溶液，进相同体积制作标准曲线（适合于手动进样）

将 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Se (IV)、Se (VI) 标准混合液配制成 0、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准系列，进样量 100 μL ，含硒量分别相当于 0、5、10、20、30、40、50 ng，以含硒量与峰面积制作标准曲线。

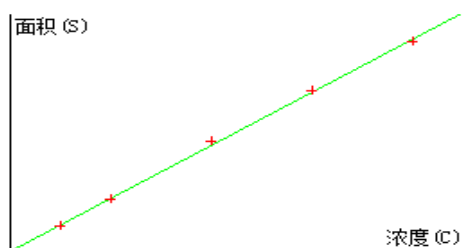


图1 Se(IV) 工作曲线
 $S = 260.7C - 155.1$; $R = 0.9996$

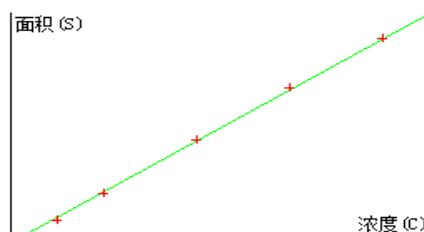


图2 Se(VI) 工作曲线
 $S = 87.1C - 921.6$; $R = 0.9990$

图 2 Se (IV)、Se (VI) 备注曲线图

采用以上两种方法制作标准曲线，相关系数均大于等于 0.9990，表明在 0-1000 $\mu\text{g/L}$ 之间，Se (IV) 和 Se (VI) 线性范围良好，为了兼顾各类样品，宜配制成 0-500 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列。

5.4 检出限和定量限

将 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Se (IV)、Se (VI) 标准混合液连续进样 11

次，进样量为 50 μL ，同时采集一段 30 min 以上的基线，计算 LOD
 $\text{Se (IV)} = 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ； $\text{LOD Se (VI)} = 3.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

按照定义，检出限为基线噪音的 3 倍，定量限为基线噪音的 10 倍，则定量限 Se (IV) 为 $5 \mu\text{g/L}$ ； Se (VI) 为 $12 \mu\text{g/L}$ 。

5.5 样品前处理方法

在提取方法研究中，我们选择了一种硒添加剂作为代表性样品进行验证。

5.5.1 酸、碱、水浸提样品中无机硒的效果

称取样品 1.0 g，分别加入 $0.5 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 、 NaOH 溶液及超纯水 10 ml，于 10 mL 带盖离心管中，于振荡器上在 70°C 、1500 rpm 下振荡提取 10 min，3000 rpm 离心 10 min，取上清液 2 mL 调 pH 至 6.0，定容至 4mL，用 $0.45 \mu\text{m}$ 针筒式过滤器过滤；另一份不调 pH 值，直接用 $0.45 \mu\text{m}$ 针筒式过滤器过滤，用 HPLC-HG-AFS 法测定无机无机硒，观察浸提剂对保留时间的影响，比较无机硒的提取量和回收率，筛选出最佳提取剂。

5.5.1.1 浸提液的 pH 值对保留时间的影响

浸提液中 HCl 溶液、超纯水、 NaOH 溶液的 pH 值分别为 0.3、1.0、1.3、5.7、12.7、13.0、13.7，样品中仅浸提出 Se (IV) ，其保留时间与标准样品偏离状况见图 3。

图 3 显示了不同浸提液与标液保留时间的偏离，酸或碱浓度越大，保留时间偏离越大，越接近 pH 6.0，偏离越小。为了能够正常辨认无机硒的峰，宜选用 pH 值在 1-13 之间的提取液，即 0.1mol/L HCl 、 0.1mol/L NaOH 或超纯水。

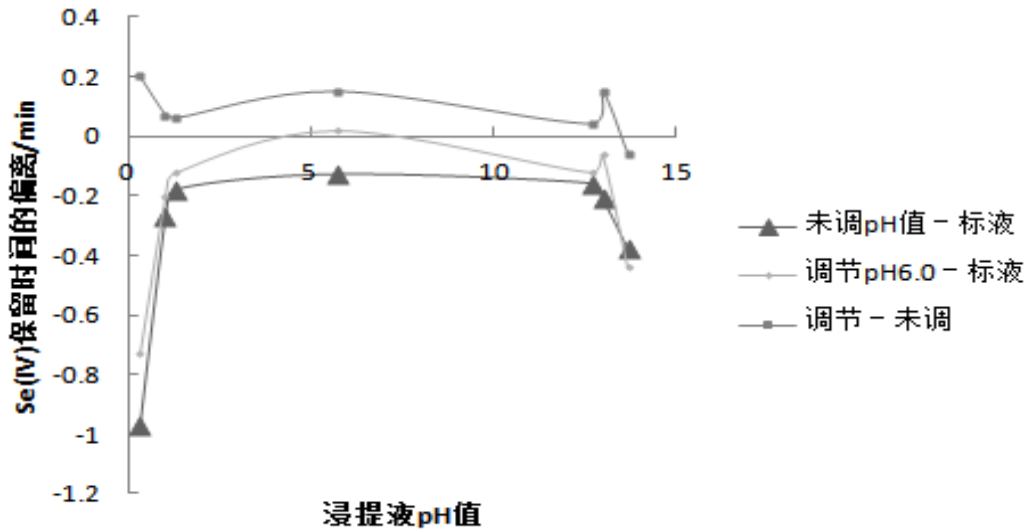


图 3 不同浸提液提取硒预混料中 Se (IV) 的保留时间与标准溶液的偏离

将浸提后溶液 pH 值调节至 6.0 后，与标液相比，除超纯水外，峰均往前移，但较未调节 pH 值前移相对较少，考虑到调节 pH 值操作较为繁琐，选择不调 pH 值。

5.5.1.2 浸提液的酸碱度对无机硒提取量的影响

不同浸提液提取样品中 Se(IV) 的结果见图 4。

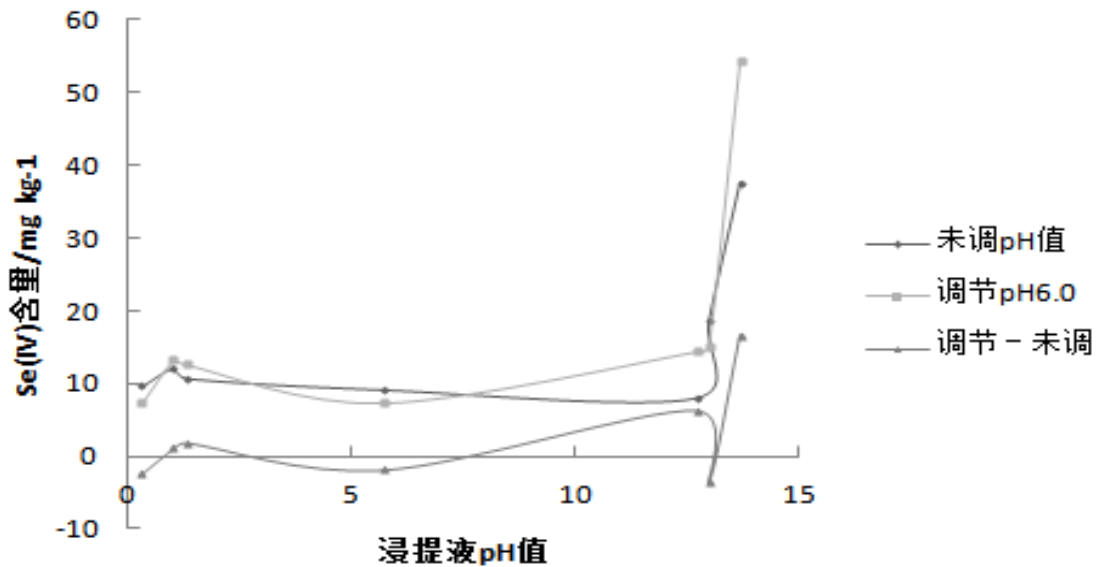


图 4 不同浓度的酸、碱、水溶液提取预混合原料中 Se (IV) 的含量

图 4 显示, 0.50 mol/L NaOH 溶液提取量远大于其他浸提剂, 可能是高浓度的碱使样品中其他形态硒降解所致, 不宜选用, 超纯水提取率比 0.10 mol/L NaOH 和 0.10 mol/L 低, 因此宜用 0.10 mol/L HCl 或 0.10 mol/L NaOH 作浸提液。

在调节 pH 值前后浸提液中含硒量均有差异, 但以 0.10 mol/L HCl 相对最小, 适宜作为无机硒的浸提液。

5.5.1.3 空白加标回收率

0.1 mol/L HCl、NaOH 溶液、超纯水的加标回收率见表 1。

表 1 不同浸提液的加标回收率 (%)

| 浸提液 | 成分 | 加标浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | | |
|--------------------------------------|---------|---|--------|--------|
| | | 30 | 50 | 100 |
| 0.1 mol \cdot L ⁻¹ HCL | Se (IV) | 75.90 | 64.68 | 81.90 |
| | Se (VI) | 55.92 | 79.09 | 70.27 |
| 0.1 mol \cdot L ⁻¹ NaOH | Se (IV) | 123.30 | 111.98 | 102.49 |
| | Se (VI) | -- | -- | -- |
| 超纯水 | Se (IV) | 101.70 | 84.50 | 91.00 |
| | Se (VI) | 95.90 | 83.56 | 97.93 |

采用 0.10 mol/L HCl 作浸提液, Se (IV)、Se (VI) 在 30-100 $\mu\text{g/L}$ 之间均低于 81.90%, 0.10 mol/L NaOH 作浸提液时, Se (VI) 降解, 均不适宜作 Se (VI) 的提取液。超纯水对 Se (IV)、Se (VI) 提取回收率均在 80%以上, 样品加标回收率最好, 但由于只能提取水溶性无机硒, 部分结合态的无机硒无法提取, Se (IV) 的提取量低于 0.1 mol/L HCl 和 NaOH。

通过以上对保留时间、浸提量、加标回收率等结果分析, 采用 HCl、NaOH 溶液和超纯水浸提预混料中的无机硒均有一定局限。

5.5.2 盐溶液浸提无机硒的效果

称取 0.10 g 样品于 10 mL 离心管中, 分别加入浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Se (IV)、Se (VI) 混合标液 0、90、150、300 μL 于离心管中, 再加入 0.1 mol/L KH_2PO_4 、KCl、 NaHCO_3 溶液及流动相, 定容至 3 mL, 于 70 $^\circ\text{C}$ 、1500 r/min 下振荡 30 min, 3000 r/min 离心 10 min, 0.45 μm 针筒式过滤器过滤, 上机分析 Se (IV) 和 Se (VI), 观察浸提液对保留时间的影响, 测定含硒量, 计算回收率, 以筛选最佳浸提液。

5.5.2.1 空白溶液加标回收率

空白浸提液中分别加入 1 mg/L 的 Se (IV) 和 Se (VI) 混合标液 90、150、300 μL , 不同浸提液的回收率见表 2。

表 2 不同浸提液的空白加标回收率 (%)

| 0.1 mol \cdot L ⁻¹ 浸提液 | 成分 | 加标浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | | |
|-------------------------------------|---------|--|--------|--------|
| | | 30 | 50 | 100 |
| KH_2PO_4 | Se (IV) | 86.43 | 93.92 | 85.69 |
| | Se (VI) | 104.39 | 101.43 | 108.26 |
| KCl | Se (IV) | 84.38 | 81.86 | 83.54 |
| | Se (VI) | 89.72 | 82.59 | 111.79 |
| NaHCO_3 | Se (IV) | 102.79 | 83.31 | 92.44 |
| | Se (VI) | 115.3 | 95.16 | 112.81 |
| 流动相 | Se (IV) | 98.12 | 96.22 | 90.70 |
| | Se (VI) | 102.36 | 115.18 | 106.66 |

采用 0.1 mol/L KH_2PO_4 、 KCl 、 NaHCO_3 溶液和流动相作浸提液， $\text{Se}(\text{IV})$ 、 $\text{Se}(\text{VI})$ 样品加标提取率均在 80%–115.30% 之间，均能够满足分析的需要。

5.5.2.2 浸提液对保留时间的影响

标液保留时间 $\text{Se}(\text{IV})$ 为 4.15min， $\text{Se}(\text{VI})$ 为 7.53min，采用 0.1 mol/L KH_2PO_4 、 KCl 、 NaHCO_3 和流动相作浸提液，不同空白盐溶液的保留时间见表 3。

表 3 空白盐溶液的保留时间偏差

| 0.1 mol · L ⁻¹ 浸提液 | | KH_2PO_4 | KCl | NaHCO_3 | 流动相 |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------|------------------|-------|
| 保留时间 偏离 (/min) | $\text{Se}(\text{IV})$ | -0.01 | -0.38 | -0.01 | -0.26 |
| | $\text{Se}(\text{VI})$ | -0.25 | -0.20 | -0.31 | -0.11 |

表 3 中， $\text{Se}(\text{IV})$ 、 $\text{Se}(\text{VI})$ 保留时间均有偏离，其中以 KCl 溶液偏离最大，提前 0.38 min，流动相其次， NaHCO_3 溶液和 KH_2PO_4 溶液偏离很小，可以忽略； $\text{Se}(\text{VI})$ 保留时间偏离 NaHCO_3 溶液 > KH_2PO_4 溶液 > KCl 溶液 > 流动相，但离其它峰较远，可以识别，因此， KCl 溶液因 $\text{Se}(\text{IV})$ 偏离太大，不适合做无机硒的浸提剂， NaHCO_3 、 KH_2PO_4 和流动相均可做无机硒的浸提剂。

5.5.2.3 浸提液对无机硒浸提量的影响

分别称取 0.10g 样品，用 0.1 mol/L KH_2PO_4 、 KCl 、 NaHCO_3 溶液和 0.1 mol/L、0.25 mol/L 流动相溶液作浸提液，无机无机硒见表 4。

表 4 盐溶液提取无机硒的含量

| 浸提液 | 0.1 mol · L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 溶液 | 0.1 mol · L ⁻¹ KCl 溶液 | 0.1 mol · L ⁻¹ NaHCO ₃ 溶液 | 0.1 mol · L ⁻¹ 流动相 | 0.25 mol · L ⁻¹ 流动相 |
|--------------------|---|-------------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| Se (IV) (mg/kg) | 13.17 | 未检出 | 4.34 | 9.80 | 11.42 |
| Se (VI) (mg/kg) | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 2.40 |

以上实验中, 仅 0.25 mol/L 流动相浸提液检出 Se (VI), Se (IV) 提取量 0.1 mol/L KH₂PO₄>0.25 mol/L 流动相>0.1 mol/L 流动相>0.1 mol/L NaHCO₃>0.1 mol/L KCl, KCl 做浸提液时, 不能检出, 0.1 mol/L NaHCO₃ 提取率太低, 均不适宜做 Se (IV) 的浸提剂, 0.25 mol/L 流动相和 0.1 mol/L KH₂PO₄ 均可作浸提液, 但 0.1 mol/L KH₂PO₄ 保留时间偏离相对较小, 且在未知样品中峰形较好, 故选作最佳浸提液。

5.3 振荡频率对提取量的影响

称取 0.10g 样品, 加 0.1 mol/L KH₂PO₄ 定容至 3 mL, 分别设置振荡频率为 300、600、900、1200、1500 r/min, 在 70 °C 下振荡 30 min, 离心, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 滤液中无机硒的提取量见图 5。

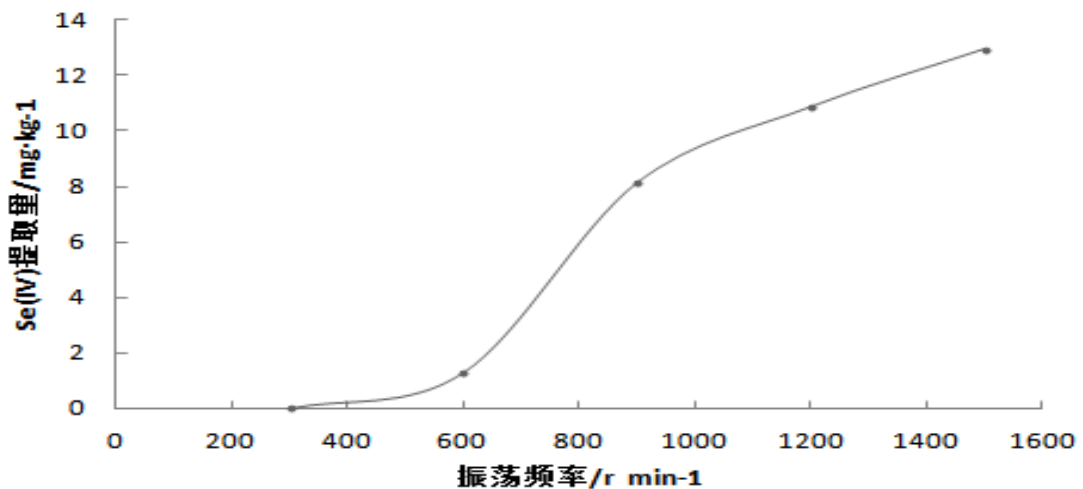


图 5 不同振荡频率下无机硒的提取量

图 5 中，振荡频率在 600 r/min 以下时，由于频率太低，样品沉积在离心管底部，不能与溶液充分混合，提取效果极差。在 600 - 1500 r/min 之间时，Se(IV) 随着振荡频率的提高而增加，同时 1500 r/min 已接近设备的最高振荡频率，因此采用 1500 r/min 作为无机硒提取的最佳振荡频率。

5.4 浸提温度对提取量的影响

称取 0.10 g 样品，加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液，定容至 3 mL，分别设置温度在 30、40、50、60、70、80、90℃，1500 r/min 下分别振荡 30 min，离心，取上清液过 0.45 μm 滤膜，滤液中无机硒提取量见图 6。

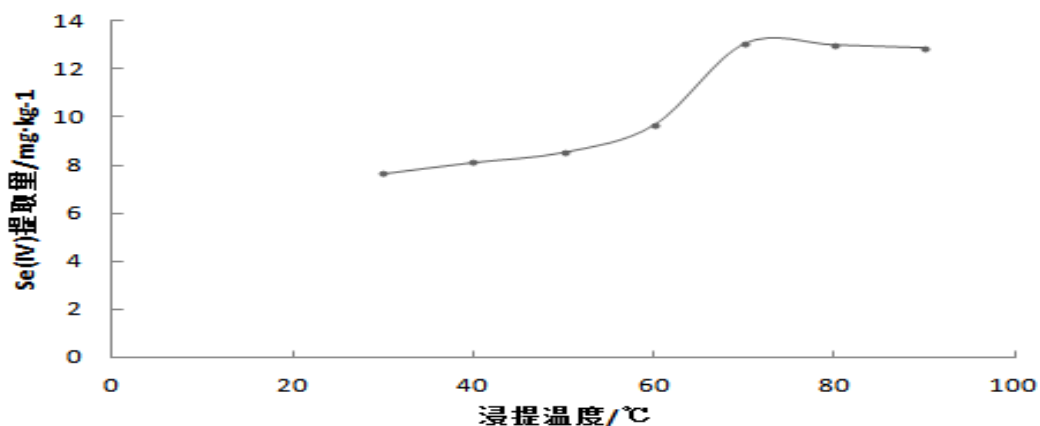


图 6 不同温度下预混料中无机硒的提取量

图 6 中，提取温度在 30—70℃ 之间，Se(IV) 提取量随温度升高而增加，70℃ 以后，温度升高，提取量趋于稳定，因此，最佳提取温度以 70℃ 为宜。

5.5 浸提时间对无机硒提取量的影响

称取 0.10g 预混料样品，加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液至 3 mL，70℃，1500 r/min 下分别振荡 10、20、30、40、50 min，离心，取

上清液过 0.45 μm 滤膜，滤液中无机硒见图 7。

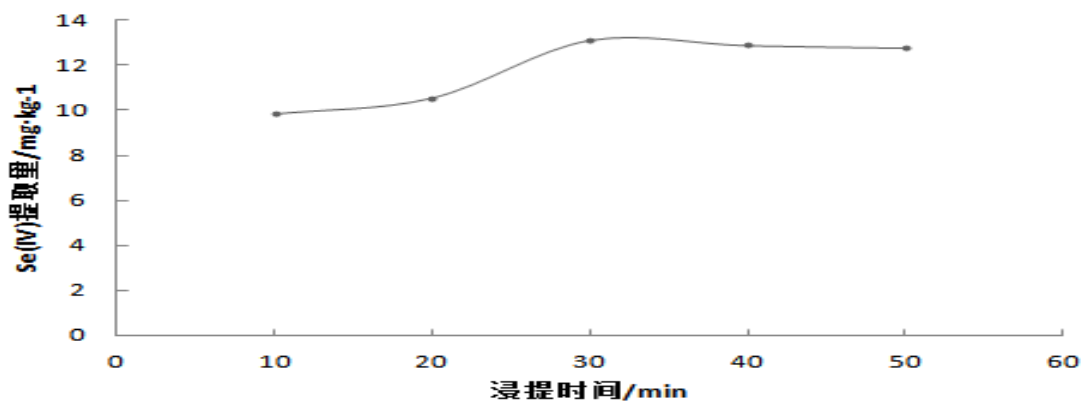


图 7 不同浸提时间下预混料中无机硒的提取量

图 7 中，30 min 前，提取量随振荡时间延长而增加；30 min 后，随着振荡提取时间延长，提取量趋于平稳且缓慢下降，因此，振荡提取时间以 30 min 为宜。

5.6 液样比对无机硒提取率的影响

5.6.1 硒蛋白粉

称取 0.10 g 硒蛋白粉样品 5 份，分别添加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液，定容至 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL，振荡 30 min，3000 r/min 离心 10 min，取上清液过 0.45 μm 滤膜，进样量 10 μL ，Se(IV)含量见图 8。

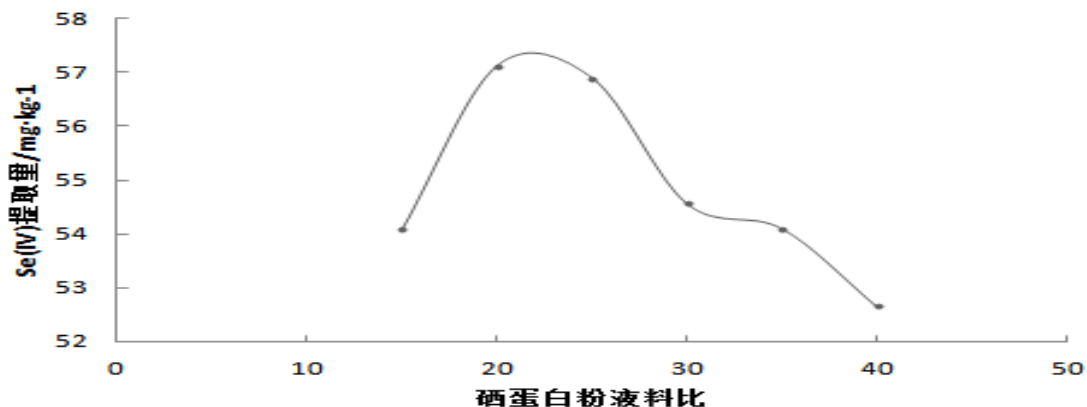


图 8 不同液样比例条件下硒蛋白粉中无机硒提取量

图 8 中，液样比 20 为硒蛋白粉中 Se(IV) 的最佳提取比例，低于 20 时，提取量较少，25-40 倍之间，随着液样比提高，样品稀释倍数加大，提取率下降。

5.6.2 碎米荠干样

称取 0.20 g 碎米荠干粉 5 份，分别添加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL，振荡 30 min，4000 r/min 离心 10 min，分别取 1、2、3、4、5 mL 于刻度试管中，浓缩至 1 mL 以下，用水定容至 1 mL，取过 0.45 μm 滤膜，进样量 10 μL ，Se(IV) 含量见图 9。

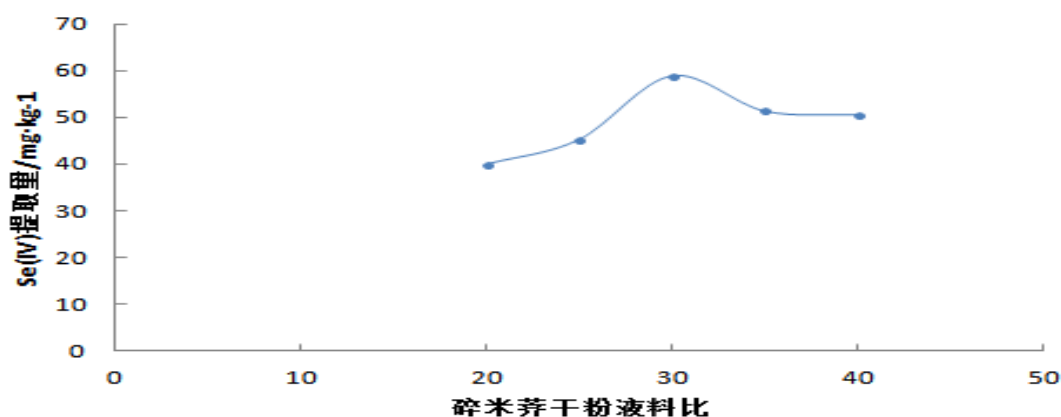


图 9 不同液样比下碎米荠干粉中无机硒提取量

图 9 中：液、样比为 30 是碎米荠干粉的最佳提取比例。

5.6.3 碎米荠鲜样

称取 1.0 g 碎米荠鲜样 5 份，分别添加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL，振荡 30 min，3000 r/min 离心 10 min，上清液用 0.45 μm 滤膜，进样量 10 μL ，无机无机硒见图 10。

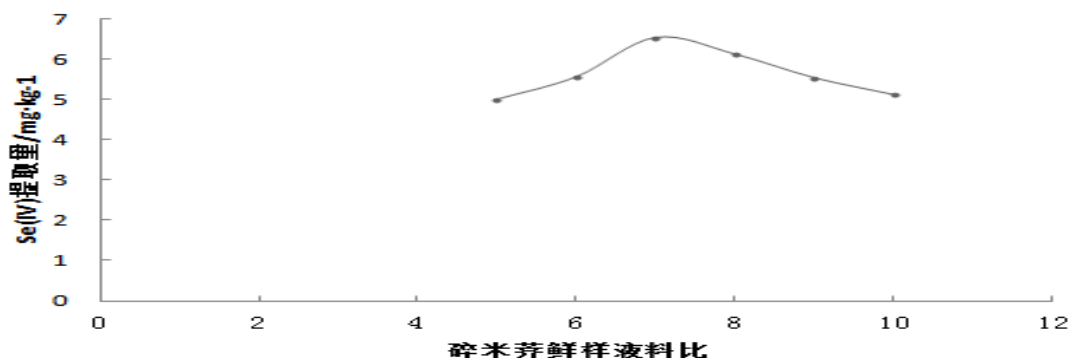


图 10 不同液样比下碎米茅鲜叶中无机硒提取量

图 10 中，碎米茅鲜样中无机硒提取的液、样比应在 6-8 之间，最佳提取比例为 7。

综合以上实验结果，提取无机硒时，称样量应在 0.1 -0.5 g 之间，加入 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液定容至 3 mL 为宜，无机无机硒高的样品可称 0.1g-0.2g，含量低的样品或鲜样可称 0.2g-0.5 g。

5.7 样品加标回收率

在浸提液、称样量、提取温度、时间、振荡频率等条件均优化的条件下，测定样品加标回收率见表 5。

表 5 不同富硒产品的加标回收率 (%)

| 样品 | 成分 | 加标量 (ng) | | |
|------------|---------|----------|--------|--------|
| | | 300 | 600 | 900 |
| 预混料 | Se (IV) | 86.28 | 94.53 | 99.44 |
| | Se (VI) | 101.08 | 99.56 | 93.24 |
| 植物硒蛋白片 | Se (IV) | 94.30 | 98.36 | 96.40 |
| | Se (VI) | 116.9 | 102.80 | 112.56 |
| 碎米茅干粉 | Se (IV) | 102.40 | 90.80 | 96.70 |
| | Se (VI) | 117.60 | 103.60 | 98.26 |
| 空白浸提液 (CK) | Se (IV) | 93.46 | 86.14 | 96.46 |
| | Se (VI) | 108.22 | 97.18 | 116.74 |

以上样品 Se (IV) 和 Se (VI) 的回收率均在 86.28%–117.60% 之间, 该方法适应于以上样品中无机硒的测定。

根据以上实验结果, 食品中无机硒的提取方法为: 称取样品 0.10 g 或鲜样 1g, 加 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液 3mL, 于超级恒温振荡器上在 70℃, 1500 rpm 条件下振荡浸提 30min, 3000r/min 离心 10min, 0.45 μm 滤膜过滤, 无机硒提取率高, 无需除去其它形态硒, Se(IV) 和 Se(VI) 均能定性定量测定, 保留时间与标准样品偏离小, 适合于以上富硒产品中无机硒的提取。

5.8 样品加标回收率测定方法的改进

在富硒茶、富硒米、富硒食用菌粉压片等样品时, 发现浸提液中没有无机硒的峰, 加入 Se(IV)、Se(VI) 标样后, 仍然检不出, 主要是因为加入的无机硒被样品中复杂的有机物所吸附, 本实验采用在样品中添加 0.1 mg/mL 的硫酸铜溶液来提高无机硒的回收率:

称取富硒大米、富硒茶叶、富硒食用菌粉片等样品 0.10 g, 每个 4 份, 分别加入 0、300、750、1500 μL 含量为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Se(IV)、Se(VI) 混合标准溶液和 0、50、150、250 μL 0.1 mg/mL 的硫酸铜溶液, 用 0.1mol/L KH_2PO_4 溶液定容至 3mL, 于超级恒温振荡器上在 70℃, 1500 rpm 条件下振荡浸提 30min, 3000r/min 离心 10min, 0.45 μm 滤膜过滤, 用高效液相色谱-氢化物原子荧光联用仪测定无机硒, 计算回收率, 结果见表 6。

表 6 无机硒标样、 Cu^{2+} 加入量与 Se(IV)、Se(VI) 回收率的关系

| 样品名称 | 硒标液加入量 (μL) | Cu^{2+} 加入量 (μL) | Se(IV) 回收率 (%) | Se(VI) 回收率 (%) |
|------|--------------------------|--|----------------|----------------|
| 富硒大米 | 0 | 0 | 未检出 | 未检出 |

| 样品名称 | 硒标液 加入量 (μL) | Cu^{2+} 加入量 (μL) | Se (IV) 回收率 (%) | Se (VI) 回收率 (%) |
|---------|------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| 富硒大米 | 300 | 50 | 38.76 | 89.24 |
| | 750 | 150 | 76.12 | 106.38 |
| | 1500 | 250 | 116.40 | 104.40 |
| 富硒茶叶 | 0 | 50 | 未检出 | 未检出 |
| | 300 | 50 | 15.80 | 44.68 |
| | 750 | 150 | 89.87 | 95.36 |
| | 1500 | 250 | 93.00 | 106.12 |
| 富硒食用菌粉片 | 0 | 0 | 未检出 | 未检出 |
| | 300 | 50 | 0.56 | 44.68 |
| | 750 | 150 | 94.77 | 99.87 |
| | 1500 | 250 | 107.60 | 114.67 |

从以上结果可以看出：添加 Cu^{2+} 可以提高样品的加标回收率，但不同样品需要添加的 Cu^{2+} 浓度不一样， $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫酸铜溶液加入量在 0-250mL 之间，样品回收率随硫酸铜溶液浓度增加而升高，当 Cu^{2+} 加入量低于 $150 \mu\text{L}$ 时，富硒茶叶、富硒食用菌粉片回收率 89.87%-99.87% 之间，可以满足分析的要求，但富硒大米的 Se (IV) 回收率仅 76.12%，低于 80%；当 Cu^{2+} 加入量为 $250 \mu\text{L}$ 时，富硒大米回收率为 104.40%-116.40%，富硒茶叶回收率为 93.00%-106.12%，富硒食用菌粉片为 107.60%-114.67%，均能满足分析测定的要求，因此，兼顾各类样品，确定 Cu^{2+} 加入量为 $250 \mu\text{L}$ 。在硒标准混合液中添加 Cu^{2+} 与不添加 Cu^{2+} 峰完全重合，说明 Cu^{2+} 只是把无机硒从样品中置换出来，并不能提高检测灵敏度。

因此确定无机硒测定样品前处理方法为：

称取样品 0.10 g ，加入 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫酸铜溶液 $250 \mu\text{L}$ ，用 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液定容至 3mL ，于超级恒温振荡器上在 70°C ，

1500 r mp 条件下振荡浸提 30min, 3000r/min 离心 10min, 0.45 μ m 滤膜过滤, 用高效液相色谱-氢化物原子荧光联用仪测定无机硒。

5.9 样品净化对分析结果的影响

选取硒蛋白粉、硒蛋白片、药片等种样品, 在浸提后采用固相萃取柱进行净化, 与净化前回收率结果比较见表 7:

表 7 固相萃取柱净化前后样品回收率

| 样品名称 | 加标浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 处理方法 | 回收率 (%) | |
|------|--|------|---------|---------|
| | | | Se (IV) | Se (VI) |
| 硒蛋白粉 | 0.5 | 净化前 | 84.29 | 94.33 |
| | | 净化后 | 77.08 | 94.29 |
| | 1.0 | 净化前 | 84.95 | 94.73 |
| | | 净化后 | 77.99 | 94.85 |
| 硒蛋白片 | 0.5 | 净化前 | 84.29 | 64.16 |
| | | 净化后 | 66.84 | 62.13 |
| | 1.0 | 净化前 | 84.95 | 73.32 |
| | | 净化后 | 78.92 | 72.81 |
| 药片 | 0.5 | 净化前 | 84.29 | 64.16 |
| | | 净化后 | 66.84 | 62.13 |
| | 1.0 | 净化前 | 84.95 | 73.32 |
| | | 净化后 | 78.92 | 72.81 |

从上表可以看出, 三个样品在净化后 Se (IV) 和 Se (VI) 回收率均低于净化前, 说明固相萃取柱对无机硒有吸附。净化的主要作用是除去有机硒小分子物质, 如硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸等, 这对背景复杂的样品 (如土壤) 很有必要, 可以减少污染, 延长色谱柱的使用寿命, 但本标准所采用的仪器方法能将这些成分完全分开, 食品经过滤后相对较干净, 因此, 不必采用固相萃取净化, 增加检测成本。

5.10 样品分析实例

5.10.1 亚硒酸钠

样品处理：称取 0.1g 亚硒酸钠于 10mL 容量瓶中，用 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液定容，再逐级稀释 1000 倍，过 0.45 μm 滤膜，进样 10 μL ~50 μL 。

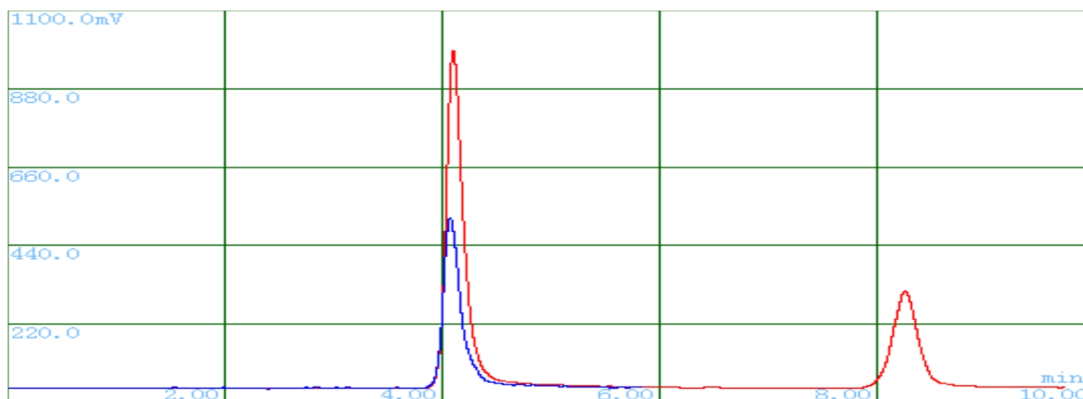


图1 亚硒酸钠

图 11 亚硒酸钠样品色谱图

(红色-无机硒标样；蓝色-亚硒酸钠，进样量 50 μL)

5.10.2 硒酸钠

样品处理：称取 0.1g 硒酸钠于 10mL 容量瓶中，用 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液定容，再逐渐稀释 1000 倍，过 0.45 μm 滤膜，进样 10 μL ~50 μL 。

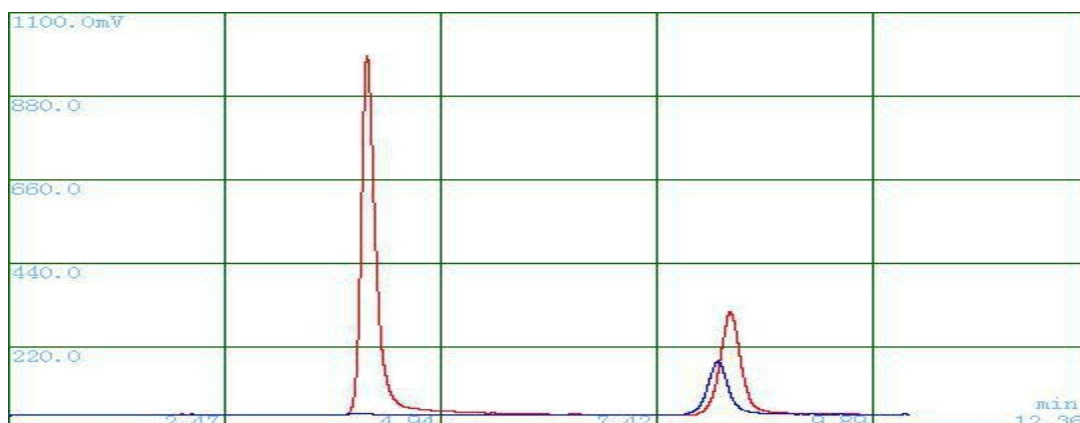


图1 硒酸钠

图 12 硒酸钠样品色谱图

(红色-无机硒标样；蓝色-硒酸钠，进样量 50 μL)

5.10.3 植物硒蛋白片

样品处理：将硒蛋白片研磨成粉末，称取 0.1 g 于 10 mL 离心管中，加入 0.1 mol/L KH₂PO₄

溶液至 3mL，70 °C 、1500 r mp 振荡 30 min，3000r/min 离心 10min，过 0.45 μm 滤膜。

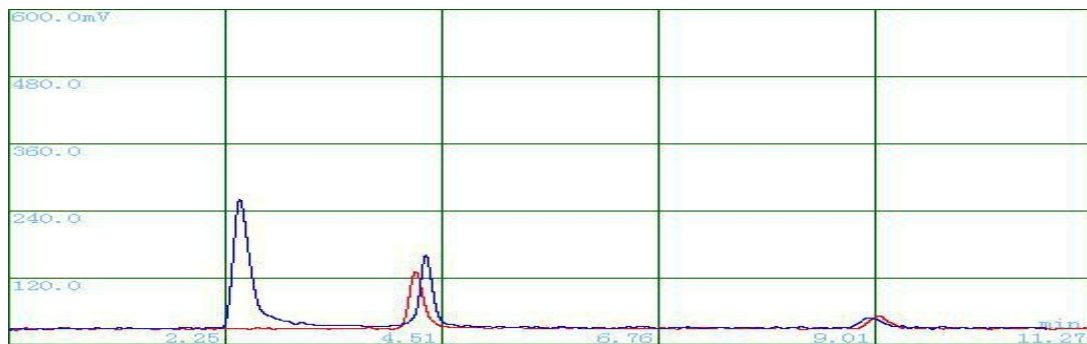


图1 硒蛋白片中无机硒

图 13 植物硒蛋白片浸提液的色谱图

(红色-无机硒标样；蓝色-硒蛋白片，进样量 50 μL)

5.10.4 硒蛋白粉

样品处理：称取 0.1 g 硒蛋白粉于 10 mL 离心管中，加入 0.1 mol/L KH₂PO₄ 溶液，定容至 3mL，70 °C 、1500 r mp 振荡 30 min，3000r/min 离心 10min，过 0.45 μm 滤膜。

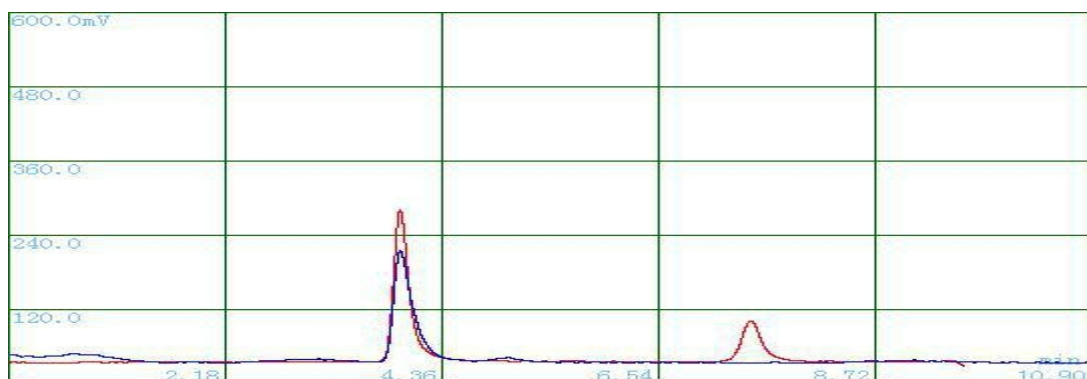


图1 硒蛋白中无机硒

图 14 硒蛋白粉浸提液的色谱图

(红色-无机硒标样；蓝色-硒蛋白粉，进样量 10 μL)

5.10.5 硒萃

样品处理：将硒萃研磨成粉末，称取 0.1 g 于 10 mL 离心管中，加入 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液，定容至 3mL，70 °C、1500 rmp 振荡 30 min，3000r/min 离心 10min，过 0.45 μm 滤膜，滤液供 HPLC-AFS 分析。

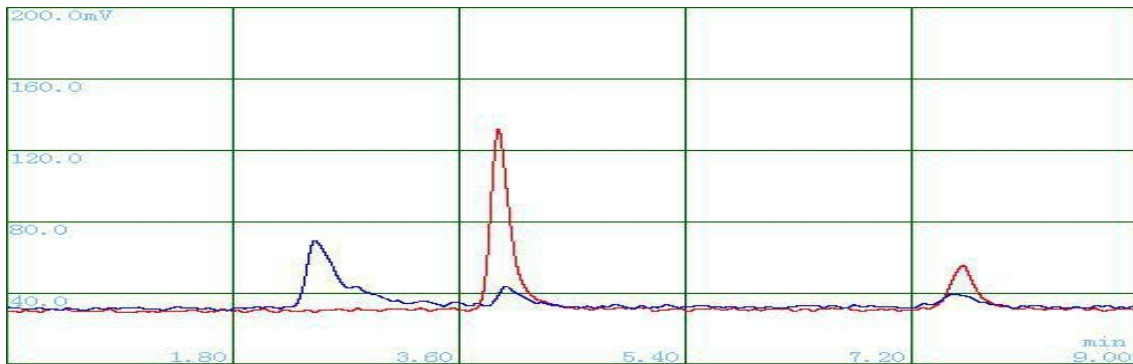
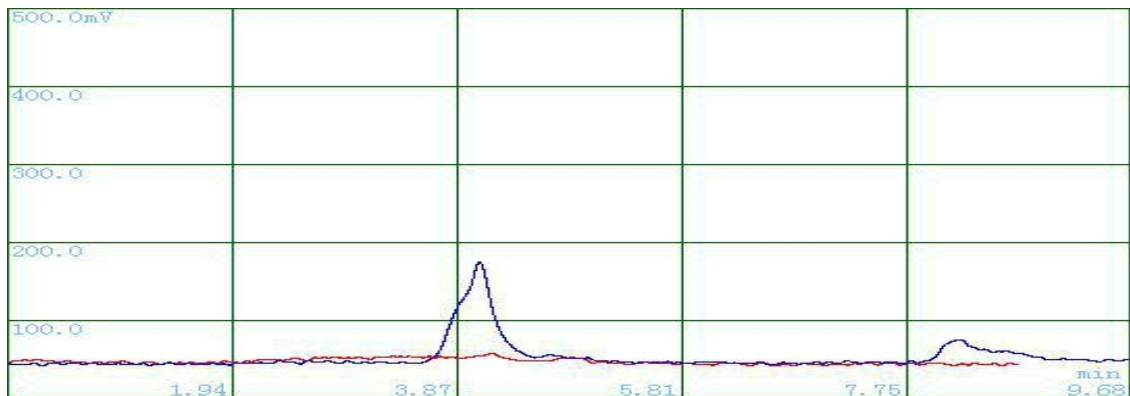


图1 硒萃中无机硒

图 15 硒萃浸提液的色谱图

(红色-无机硒标样；蓝色-硒萃，进样量 10 μL)

5.10.6 硒蛹虫草片



硒虫草食用菌粉片 红色，50uL；蓝色，加标样10uL

图 16 硒用虫草食用菌压片浸提液的色谱图

样品处理同硒萃。

5.10.7 碎米茅

样品处理：将碎米茅洗净烘干，粉碎后过 60 目，称取 0.1 g 于 10 mL 离心管中，加入 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液至 3mL，70 °C、

1500 r mp 振荡 30 min, 3000r/min 离心 10min 过 0.45 μm 滤膜。

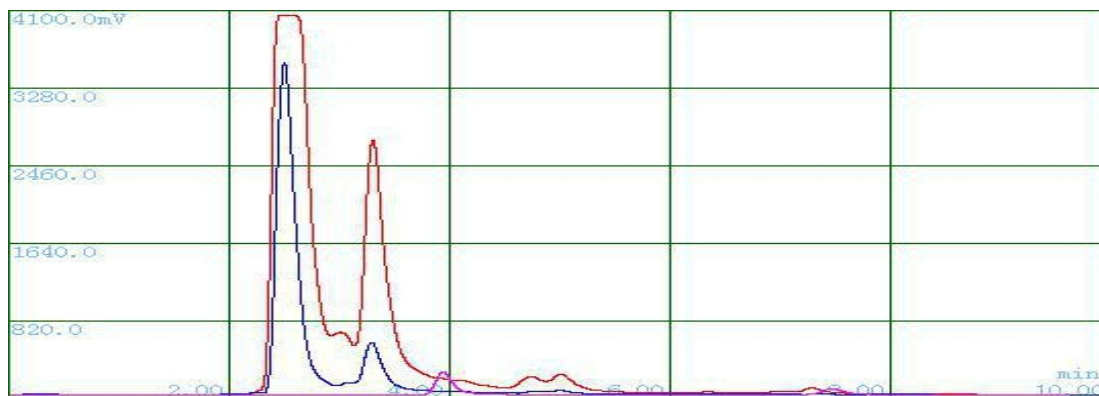


图1 碎米荠不同进样量 (10 μl 、50 μl 比较)

图 17 碎米荠浸提液不同进样量的色谱图比较

(红色-碎米荠, 进样量 50 μL ; 蓝色-碎米荠, 进样量 10 μL ; 紫色-无机硒标样)

上图中, 前 2 峰分别为硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸, 进样 10 μL 时 Se (IV)、Se (VI) 均无峰, 进样 50 μL 时会出现 Se (VI), 而 Se (IV) 不明显。

5.10.8 碎米荠环己烷萃取实验

称取碎米荠样品 3 份于 10 mL 离心管中, 用 0.1 mol/L KH_2PO_4 溶液提取后过滤, 滤液分别用环己烷萃取 1 次、2 次, 静止后取水相进行 HPLC-AFS 分析。

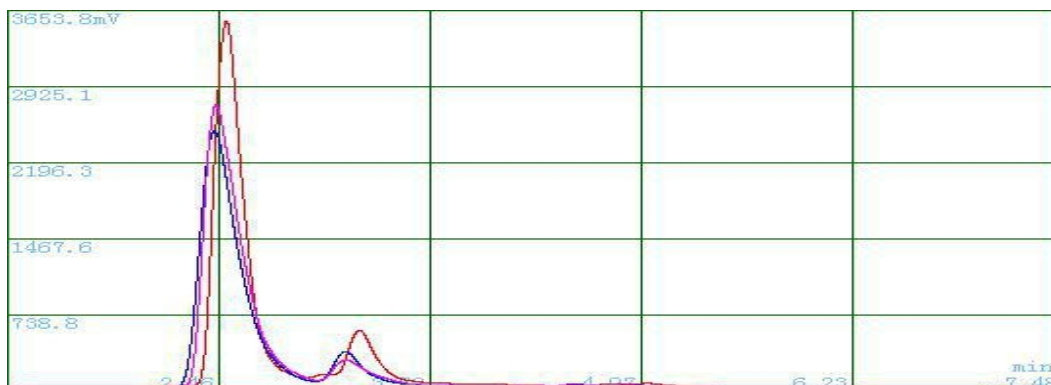


图1 碎米荠环己烷萃取次数比较

图 18 碎米荠浸提液萃取前后的色谱图比较

(红色: 滤液未萃取; 紫色-碎米荠, 滤液萃取 1 次; 蓝色: 萃取 2 次, 进样量 10 μL)

上图中，水相中有机硒峰在萃取前后相差不大，说明环己烷对硒代氨基酸的萃取率很小。

5.11 精密度、重现性和准确度

5.11.1 连续性精密度(平行性)

在本实验室，由同一操作者使用相同的前处理方法和设备，分别在一周内对亚硒酸钠、硒酸钠、硒蛋白片、硒蛋白粉等样品进行20次测定，结果见表 8-1 和 8-2 。

表 8-1 不同样品的连续性测定结果

| 参数/测定次数 | 两种原料药中 Se 的质量分数 (%) | |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Na ₂ SeO ₄ | Na ₂ SeO ₃ |
| 1 | 41.76 | 45.67 |
| 2 | 41.68 | 45.46 |
| 3 | 41.72 | 45.99 |
| 4 | 41.50 | 45.50 |
| 5 | 41.11 | 45.63 |
| 6 | 41.66 | 45.46 |
| 7 | 41.70 | 45.94 |
| 8 | 41.55 | 45.96 |
| 9 | 41.55 | 45.96 |
| 10 | 41.46 | 45.34 |
| 11 | 41.08 | 45.96 |
| 12 | 41.97 | 45.60 |
| 13 | 41.43 | 45.77 |
| 14 | 41.36 | 45.41 |
| 15 | 41.63 | 45.62 |
| 16 | 41.41 | 45.74 |
| 17 | 41.84 | 45.75 |
| 18 | 41.78 | 45.39 |
| 19 | 41.39 | 45.69 |
| 20 | 41.87 | 45.31 |
| 平均值 (%) | 41.57 0.094 | 45.66 0.194 |
| 标准偏差 (%) | 0.2357 0.0022 | 0.2251 0.0023 |
| 相对标准偏差 RSD (%) | 0.57 2.37 | 0.49 1.22 |

表 8-2 不同样品的连续性测定结果 (续)

| 参数/测定次数 | 植物硒蛋白片 (mg/kg) | | 硒蛋白粉 (mg/kg) | |
|----------------|----------------|---------|--------------|---------|
| | Se (IV) | Se (VI) | Se (IV) | Se (VI) |
| 1 | 1.40 | 3.74 | 1.69 | -- |
| 2 | 1.38 | 3.65 | 1.68 | -- |
| 3 | 1.41 | 3.77 | 1.69 | |
| 4 | 1.42 | 3.68 | 1.71 | |
| 5 | 1.39 | 3.71 | 1.72 | |
| 6 | 1.39 | 3.76 | 1.70 | |
| 7 | 1.41 | 3.69 | 1.67 | |
| 8 | 1.42 | 3.72 | 1.68 | |
| 9 | 1.40 | 3.72 | 1.66 | |
| 10 | 1.43 | 3.67 | 1.67 | |
| 11 | 1.37 | 3.69 | 1.65 | |
| 12 | 1.40 | 3.73 | 1.71 | |
| 13 | 1.38 | 3.67 | 1.70 | |
| 14 | 1.42 | 3.66 | 1.69 | |
| 15 | 1.43 | 3.73 | 1.68 | |
| 16 | 1.41 | 3.71 | 1.70 | |
| 17 | 1.37 | 3.72 | 1.71 | |
| 18 | 1.40 | 3.75 | 1.68 | |
| 19 | 1.42 | 3.73 | 1.66 | |
| 20 | 1.43 | 3.69 | 1.68 | |
| 平均值 (mg/kg) | 1.40 | 3.71 | 1.69 | |
| 标准偏差 (%) | 0.019 | 0.034 | 0.019 | |
| 相对标准偏差 RSD (%) | 1.70 | 1.43 | 1.12 | |

硒酸钠、亚硒酸钠相对标准偏差 (RSD %) 为 0.49 % ~ 0.57 % ,
植物硒蛋白片、硒蛋白粉相对标准偏差 (RSD %) 为 0.11 % ~ 0.14 % ,

说明方法的连续性精密度很好。

5.11.2 重复性精密度

在本实验室，由同一操作者使用相同的设备，按照相同的测试方法，在不同时间(三个月内)分 4 次分别对亚硒酸钠、硒蛋白片和硒蛋白粉中的 Se (IV) 和 Se (VI) 进行了 20 次测定，结果列于表 9-1 和 9-2 。

表 9-1 硒酸钠、亚硒酸钠方法重复性测定结果

| 20 次测定值 (mg/kg) | | | | | | | 平均值 (%) | 每次的 标准差 | $S_Y = \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{m}}$ | $I_Y = 2.83S_Y$ |
|--------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------|------------|-------------------------------------|-----------------|
| 硒 酸 钠 | 1 | 41.76 | 41.11 | 41.55 | 41.43 | 41.84 | 41.54 | 0.2896 | 0.05143 | 0.1455 |
| | 2 | 41.68 | 41.66 | 41.46 | 41.36 | 41.78 | 41.59 | 0.1724 | | |
| | 3 | 41.72 | 41.70 | 41.08 | 41.63 | 41.39 | 41.50 | 0.2710 | | |
| | 4 | 41.50 | 41.55 | 41.97 | 41.41 | 41.87 | 41.66 | 0.2452 | | |
| 亚 硒 酸 钠 | 1 | 45.67 | 45.63 | 45.96 | 45.77 | 45.75 | 45.76 | 0.1276 | 0.09717 | 0.2750 |
| | 2 | 45.46 | 45.46 | 45.34 | 45.41 | 45.39 | 45.41 | 0.0507 | | |
| | 3 | 45.99 | 45.94 | 45.96 | 45.62 | 45.69 | 45.84 | 0.1716 | | |
| | 4 | 45.50 | 45.96 | 45.60 | 45.74 | 45.31 | 45.62 | 0.2454 | | |

表 9-1 中 S_Y 代表四次测定之间的标准差， I_Y 为置信水平为 95 % 的最大允差，它的意义是：用相同的方法测定相同的样品，测得任何两个结果的绝对差超为 I_Y 值的可能性只有可以看出亚硒酸钠中 Se(IV) 平均值最大值是 41.66%，最小值是 41.50%，两者之间的差值为 0.16%，小于 0.1455；硒酸钠中 Se(VI) 平均值最大值是 45.84%，最小值是 45.41%，两者之间的差值为 0.43%，小于 0.2750，说明本方法的精密度是可以接受的。

表 9-2 富硒产品方法重复性测定结果

| 20 次测定值 (mg/kg) | | | | | | | 平均值 (mg/kg) | 每次的 标准差 | $S_Y = \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{m}}$ | $I_Y = 2.83S_Y$ |
|------------------------|---|------|------|------|------|------|----------------|------------|-------------------------------------|-----------------|
| 硒蛋 白片 Se (IV) | 1 | 1.40 | 1.43 | 1.41 | 1.38 | 1.37 | 1.40 | 0.024 | 0.003866 | 0.01094 |
| | 2 | 1.38 | 1.39 | 1.42 | 1.42 | 1.40 | 1.40 | 0.018 | | |
| | 3 | 1.41 | 1.41 | 1.37 | 1.43 | 1.42 | 1.41 | 0.023 | | |
| | 4 | 1.39 | 1.42 | 1.4 | 1.41 | 1.43 | 1.41 | 0.016 | | |
| 硒蛋 白片 Se(VI) | 1 | 3.74 | 3.72 | 3.71 | 3.72 | 3.67 | 3.71 | 0.026 | 0.01398 | 0.03957 |
| | 2 | 3.65 | 3.67 | 3.76 | 3.75 | 3.66 | 3.70 | 0.053 | | |
| | 3 | 3.77 | 3.69 | 3.69 | 3.73 | 3.73 | 3.72 | 0.033 | | |
| | 4 | 3.68 | 3.73 | 3.72 | 3.69 | 3.71 | 3.71 | 0.021 | | |
| 硒蛋 白粉 Se(IV) | 1 | 1.69 | 1.72 | 1.66 | 1.70 | 1.71 | 1.70 | 0.0230 | 0.0051 | 0.01456 |
| | 2 | 1.68 | 1.70 | 1.71 | 1.69 | 1.68 | 1.69 | 0.0130 | | |
| | 3 | 1.69 | 1.67 | 1.69 | 1.68 | 1.70 | 1.69 | 0.0114 | | |
| | 4 | 1.71 | 1.68 | 1.71 | 1.70 | 1.68 | 1.70 | 0.0152 | | |
| 硒蛋 白粉 Se(VI) | 1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 |
| | 2 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |
| | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |
| | 4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |

硒蛋白片中 Se(VI) 平均值最大值是 1.41 mg/kg，最小值是 1.40 mg/kg，两者之间的差值为 0.01 mg/kg，小于 0.01094；Se(IV) 平均值最大值是 3.72 mg/kg，最小值是 3.70 mg/kg，两者之间的差值为 0.02 mg/kg，小于 0.03957；硒蛋白粉中 Se(IV) 平均值最大值是 1.70 mg/kg，最小值是 1.69 mg/kg，两者之间的差值为 0.01 mg/kg，小于 0.01456，说明本方法的精密度是可

以接受的。

5.11.3 方法的准确度

按照 GB/ T5009.1-2003 定义,准确度为测定平均值与真值的相符程度。准确度的测定为某一稳定样品中加入不同水平已知量的标准物质(将标准物质的量作为真值)称加标样品。同时测定样品和加标样品,加标样品扣除样品值与标准物质的误差即为该方法的准确度。

分别在样品中加入 0、1.0、3.0、5.0 mg/L 的 Se(IV)、Se(VI) 混合标样后测定,每个样品重复 5 次,计算样品加标回收率见表 10。

表 10 方法回收率测定结果

| 样品名称 | 添加浓度 (ug/mL) | Se(IV) | | | Se(VI) | | |
|--------|--------------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|----------------|
| | | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 RSD% | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 <i>Si</i> |
| 植物硒蛋白片 | 1.0 | 111.22 | 116.76 | 3.24 | 94.89 | 101.87 | 4.19 |
| | | 119.56 | | | 102.22 | | |
| | | 118.22 | | | 106.22 | | |
| | | 116.82 | | | 102.89 | | |
| | | 117.98 | | | 103.12 | | |
| | 3.0 | 118.51 | 118.33 | 0.53 | 117.24 | 115.32 | 1.26 |
| | | 118.98 | | | 115.71 | | |
| | | 118.58 | | | 114.04 | | |
| | | 117.68 | | | 115.23 | | |
| | | 117.91 | | | 114.38 | | |
| | 5.0 | 119.72 | 118.48 | 1.23 | 118.26 | 116.09 | 1.53 |
| | | 117.62 | | | 114.29 | | |
| | | 119.92 | | | 115.96 | | |
| | | 117.71 | | | 115.16 | | |
| | | 117.44 | | | 116.78 | | |

| 样品名称 | 添加浓度 (ug/mL) | Se (IV) | | | Se (VI) | | |
|------|-----------------|------------|--------------|--------------|------------|--------------|-------------------|
| | | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 RSD% | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 <i>Si</i> |
| 硒虫草 | 1.0 | 118.67 | 116.46 | 1.32 | 106.00 | 104.92 | 0.67 |
| | | 116.40 | | | 104.40 | | |
| | | 115.20 | | | 105.00 | | |
| | | 115.89 | | | 104.35 | | |
| | | 116.12 | | | 104.83 | | |
| | 3.0 | 107.60 | 114.12 | 3.93 | 114.67 | 114.65 | 1.49 |
| | | 114.47 | | | 115.73 | | |
| | | 118.00 | | | 118.13 | | |
| | | 116.12 | | | 116.71 | | |
| | | 114.39 | | | 118.02 | | |
| | 5.0 | 108.10 | 115.21 | 4.25 | 99.87 | 113.41 | 7.69 |
| | | 116.87 | | | 116.80 | | |
| | | 119.43 | | | 118.93 | | |
| | | 116.33 | | | 116.11 | | |
| | | 115.32 | | | 115.34 | | |
| 水 | 1.0 | 84.60 | 87.12 | 1.69 | 96.40 | 92.39 | 2.26 |
| | | 86.20 | | | 91.60 | | |
| | | 88.60 | | | 91.00 | | |
| | | 88.33 | | | 91.30 | | |
| | | 87.87 | | | 91.63 | | |
| | 3.0 | 91.13 | 94.14 | 1.95 | 90.40 | 96.54 | 3.48 |
| | | 93.20 | | | 97.20 | | |
| | | 95.33 | | | 98.80 | | |
| | | 95.39 | | | 97.83 | | |
| | | 95.64 | | | 98.46 | | |

| 样品名称 | 添加浓度 (ug/mL) | Se (IV) | | | Se (VI) | | |
|------|--------------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|----------------|
| | | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 RSD% | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | 标准偏差 <i>Si</i> |
| 水 | 5.0 | 87.57 | 92.81 | 5.03 | 86.53 | 89.36 | 3.32 |
| | | 89.93 | | | 95.10 | | |
| | | 100.87 | | | 87.87 | | |
| | | 92.34 | | | 88.78 | | |
| | | 93.32 | | | 88.54 | | |
| 植物油 | 1.0 | 118.07 | 118.49 | 0.78 | 110.60 | 111.67 | 0.94 |
| | | 119.87 | | | 111.20 | | |
| | | 118.07 | | | 113.00 | | |
| | | 118.12 | | | 112.21 | | |
| | | 118.33 | | | 111.33 | | |
| | 3.0 | 118.29 | 118.08 | 0.28 | 102.40 | 103.73 | 0.27 |
| | | 118.05 | | | 105.80 | | |
| | | 118.37 | | | 103.36 | | |
| | | 118.02 | | | 103.87 | | |
| | | 117.66 | | | 103.23 | | |
| | 5.0 | 117.07 | 117.67 | 1.84 | 95.92 | 100.79 | 3.84 |
| | | 117.03 | | | 98.46 | | |
| | | 118.93 | | | 106.04 | | |
| | | 117.18 | | | 101.34 | | |
| | | 118.12 | | | 102.18 | | |

添加浓度在 0.01 ~ 0.1 mg/kg 之间, 准确度要求允许的相对标准偏差 < 20 % , 添加浓度 > 0.10 mg/kg 时, 允许的相对标准偏差 < 15 % 。以上不同类型的 4 个样品回收率在 87.12%-118.49% 之间, RSD%在 0.27%-5.03%之间, 说明测定结果是准确的。

5.11.4 方法验证

5.11.4.1 方法验证过程

《富硒食品中无机硒的测定 原子荧光形态分析法》和《硒酸盐、亚硒酸盐中无机硒的测定 原子荧光形态分析法》标准草案方法形成后，通过筛选确定 3 家验证单位，对其线性范围、检出限、定量限、准确度和精密度进行验证。具体结果见附件 1、2、3：实验室验证报告。

5.11.4.2 各实验室的仪器设备、线性范围、相关系数和检测限

在标准起草单位和验证单位共 4 个单位中，除起草单位使用的仪器为 Water2965 高效液相色谱+SAP-10 形态分析预处理装置+原子荧光光谱联用仪外，其它 3 家单位均使用北京吉天、海光科技仪器公司的原子荧光形态分析仪。在验证中，进样浓度在 0-0.50 $\mu\text{g/mL}$ 之间，相关系数均大于 0.9990，线性关系良好；检测限 Se(IV) 为 1.2 $\mu\text{g/kg}$ ，Se(VI) 为 1.5 $\mu\text{g/kg}$ ；定量限 Se(IV) 为 4 $\mu\text{g/kg}$ ；Se(VI) 为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。RSD%均小于 5%。

5.11.4.3 各实验室的方法回收率汇总

选取植物硒蛋白片做代表性样品做了加标浓度为 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 3 个浓度水平的试验，每个浓度水平独立检测 5 次，4 个实验室的准确度、精密度汇总如下：

表 11 实验室间方法回收率验证数据汇总表

| 实验室 | 成分 | 水平 1 | | | 水平 2 | | | 水平 3 | | |
|-----|--------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|
| | | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> |
| 1 | Se(IV) | 116.76 | 3.24 | 2.77 | 118.33 | 0.53 | 0.45 | 118.48 | 1.23 | 1.04 |
| | Se(VI) | 101.87 | 4.19 | 4.11 | 115.32 | 1.26 | 1.09 | 116.09 | 1.53 | 1.32 |

| 实验室 | 成分 | 水平 1 | | | 水平 2 | | | 水平 3 | | |
|-----|---------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|
| | | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> |
| 2 | Se (IV) | 102.82 | 2.48 | 2.41 | 105.42 | 2.45 | 2.32 | 98.38 | 1.95 | 1.98 |
| | Se (VI) | 97.98 | 2.15 | 2.19 | 102.40 | 2.55 | 2.49 | 100.10 | 4.38 | 4.38 |
| 3 | Se (IV) | 104.06 | 1.98 | 1.90 | 93.02 | 2.35 | 2.53 | 98.16 | 2.50 | 2.55 |
| | Se (VI) | 102.85 | 2.07 | 2.01 | 88.13 | 2.16 | 2.45 | 85.12 | 1.58 | 1.86 |
| 4 | Se (IV) | 105.69 | 4.99 | 4.72 | 104.71 | 4.27 | 4.08 | 101.28 | 3.73 | 3.68 |
| | Se (VI) | 97.07 | 4.15 | 4.28 | 95.41 | 1.21 | 1.27 | 104.09 | 3.39 | 3.26 |

以上在 4 个不同实验室之间，Se(IV) 和 Se(VI) 回收率在 85.12%–118.33%之间，说明方法准确度较好。

5.11.4.4 各实验室的方法精密度汇总

在 3 个国家认可的实验室进行了方法的精密度验证工作，在 4 种不同类型的样品按照《富硒食品中无机硒的测定 原子荧光形态分析法》和《硒酸盐、亚硒酸盐中无机硒的测定原子荧光形态分析法》中的步骤进行盲样测试，除硒虫草和矿泉水未检出无机硒外，其余 3 个样品的结果见表 12:

表 12 实验室间方法精密度验证数据汇总表

| 实验室 | 成分 | 亚硒酸钠 | | | 硒酸钠 | | | 硒蛋白粉 | | |
|-----|---------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|
| | | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> | <i>X_i</i> | <i>S_i</i> | <i>RSD%</i> |
| 1 | Se (IV) | 45.66 | 0.2251 | 0.49 | | | | 1.86 | 0.024 | 1.70 |
| | Se (VI) | | | | 41.57 | 0.24 | 0.57 | 0.04 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | Se (IV) | 44.61 | 1.54 | 1.21 | | | | 1.74 | 0.074 | 4.26 |
| | Se (VI) | | | | 40.44 | 0.49 | 1.21 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | Se (IV) | 44.10 | 0.04 | 0.09 | | | | 2.04 | 0.039 | 1.95 |
| | Se (VI) | | | | 40.63 | 0.04 | 0.10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | Se (IV) | 45.12 | 0.25 | 0.54 | | | | 1.78 | 0.030 | 1.68 |
| | Se (VI) | | | | 41.44 | 0.65 | 1.58 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

| 实验室 | 成分 | 亚硒酸钠 | | | 硒酸钠 | | | 硒蛋白粉 | | |
|-------------|---------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| | | <i>Xi</i> | <i>Si</i> | <i>RSD%</i> | <i>Xi</i> | <i>Si</i> | <i>RSD%</i> | <i>Xi</i> | <i>Si</i> | <i>RSD%</i> |
| <i>Xi</i> | Se (IV) | 44.87 | | | | | | 1.89 | | |
| | Se (VI) | | | | 41.02 | | | | | |
| <i>Si</i> | Se (IV) | 6.70 | | | | | | 0.13 | | |
| | Se (VI) | | | | 5.68 | | | | | |
| <i>RSD%</i> | Se (IV) | 1.49 | | | | | | 6.94 | | |
| | Se (VI) | | | | 1.38 | | | | | |

以上 4 个实验室间 Se (IV)、Se (VI) 相对标准偏差结果 $\leq 6.94\%$ ，说明分析测试过程中无明显的系统误差，证明标准物质在不同的食品成份中，进行样品分析，结果是可靠的。

六、征求意见的采纳情况

标准征求意见稿形成后，发到大专院校、科研院所和企业等 10 个单位的专家征求意见，发出邮件 10 份，收回 10 份，共收集意见 40 条（见附件 4 征求意见表），意见汇总后，标准编写小组对各位专家意见逐条分析，对照修改。根据专家建议，标准规定了作为硒酸盐、亚硒酸盐的硒酸盐、亚硒酸盐和富硒食品中无机硒的检测方法，但二者在前处理方法和计算公式上相差很大，在一起容易混淆，因此分成《富硒食品中无机硒的测定》和《硒酸盐、亚硒酸盐中无机硒的测定》两个标准，形成送审稿。

七、标准实施建议

该标准集成了现阶段先进的仪器设备和检测技术，集样品净化、检测为一体，操作简单实用、时效性强，有效规避了相关地方标准中提取分离不完全、需消化后测定总硒、不能分离硒形态等缺陷，

能够测定硒酸盐、亚硒酸盐和富硒食品中无机无机硒，对科研工作和企业产品开发具有划时代的意义，急需替代原地方标准《富有机硒食品无机硒要求》（DBS42/002-2014）附录中无机硒的测定方法，建议作为强制性标准实施。